

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

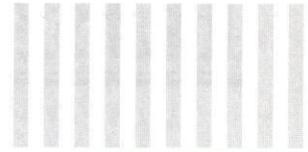
SUMÁRIO

Utilização do antígeno prostático específico (PSA livre/total), como marcador tumoral no diagnóstico de câncer de próstata e hiperplasia benigna prostática	3
<i>Isabel Cristina R. Araújo Cardoso; Maria das Graças Alves Benfica; Chequer Buffe Chamone; Getislaine França de Castro & Klívia Borges Peixoto</i>	
Use of PSA (free and total) as tumoral marker in the diagnosis of prostate cancer and prostatic benign hyperthophy	
Tipagem HLA-classe II de pacientes portadores de Diabetes mellitus insulino-dependentes	7
<i>Maria Inês de Moura Campos Pardini; Paula de Oliveira Montandon Hokama; Elenice Deffune & Paulo Eduardo de Abreu Machado</i>	
Class-II HLA typing of patients with Diabetes mellitus insulin-dependent	
Infecção pelo Papiloma Virus Humano: correlação cito-histológica e avaliação dos sinais citológicos não clássicos	11
<i>Lara Verônica De Araújo Lopes & Paula Ávila Fernandes</i>	
Human papillomavirus infection: cyto-histologic correlation and analysis of the non classic cytologic signs	
Avaliação da interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias	15
<i>Edson L. da Silva; Flávia Martinello; Emília R. Scharf; Daniel M. de Luca; Gabriela R. Amorin; Leandro Corradi & Toni R. Martins</i>	
Evaluation of ascorbic acid interference in reactions for analysis of urinary glucose and hemoglobin	
Antígeno prostático específico e descrição de novos marcadores para o câncer de próstata	21
<i>Rose Daher & Mona Beaini</i>	
Prostate-specific antigen and new related markers for prostate cancer	
Análise dos hemogramas de ratos submetidos à ação da peçonha de Bothrops jararaca	31
<i>M. G. S. Pires; R. N. Moresco; L. C. Manetti; L. P. Spillari; T. P. Munhoz & J. R. Oliveira</i>	
Hemograms analysis from rats submitted to Bothrops jararaca venom	
Utilização do sistema automatizado BacT/Alert® para o cultivo de fluidos biológicos não sanguíneos	35
<i>Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva</i>	
Use of BacT/Alert® System for culturing biological fluids other than blood	
Excreção de oligossacarídeos em indivíduos com Doença de Gaucher tipo 1	39
<i>Dênis Reis de Assis, Ana Paula Costa Beheregaray, Ricardo Flores Pires, Cristiano Silveira da Silva, Kristiane Michelin, Roberto Giugliani & Janice Carneiro Coelho</i>	
Oligosaccharide excretion in subjects with Gaucher Disease type 1	
Avaliação da dosagem de Proteína C-Reativa no soro e líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico diferencial das meningites bacterianas e meningites de etiologia presumivelmente viral	43
<i>Edna Maria Vissoci Reiche, Jaqueline Capobianco, Gisele Alcântara de Oliveira, Helena Kaminami Morimoto, Tieme Matsuo, Sueli Hiromi Tuboi, Sílvia Tieko Yasunaga, Elaine Regina Delicato, Ana Paula Correa Pardal & Jovelina Almeida de Andrade</i>	
Evaluation of C-Reactive Protein determination in the serum and cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of bacterial meningitis and presumed viral meningitis	
Pesquisa de eosinófilos em secreção nasal no Hospital Universitário de Florianópolis	49
<i>S.T. Steinwandter; P. Tenconi & P. Haas</i>	
A research on eosinophils in nasal secretion at the Florianópolis University Hospital	
Formação de agentes multiplicadores em doenças parasitárias	53
<i>Dina Lúcia Moraes Falavigna, Ana Lúcia Falavigna Guilherme, Silvana Marques de Araújo, Áurea Regina Teles Pupulim, Maria Luiza Gaspar Goulart Dias & Nadir Rodrigues Marcondes</i>	
The formation of multiplier agents in parasitic diseases	
Retrospectiva	56

1

VOLUME 32

2000



PNCQ - uma empresa certificada pelo INMETRO/ABNT

Várias razões levam hoje as empresas a uma avaliação e certificação de seu Sistema da Qualidade:

- Por conveniência, ao verificar que os concorrentes, sendo certificados, deles se valem para divulgar melhor seu produto.
- Por imposição legal, quando pela existência de legislação normativa, o cliente exige a referida certificação.
- Voluntariamente, quando os administradores da empresa chegam a conclusão de que o sistema da qualidade é necessário para melhor servir os seus clientes, além de facilitar a administração dos seus processos.

No Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ, patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, a necessidade de nossa certificação foi crescendo progressivamente e sendo exigida nos vários processos produtivos do programa, até que a alta administração, achou por bem iniciar a preparação da documentação necessária para a implantação e certificação do seu sistema da qualidade.

Este processo documental foi evoluindo gradativamente, tendo sido aproveitado para implementar novos procedimentos da qualidade além dos administrativos.

Na implantação e treinamento dos procedimentos houve, como sempre, a necessidade de conscientizar os funcionários a cultura do sistema e, até mesmo, revisão dos procedimentos já escritos.

Toda essa trajetória teve a colaboração da empresa de consultoria BRQC - Brazilian Quality Consulting S/C Ltda., que muito ajudou com a experiência do seu "staff".

Como entidade certificadora, foi escolhida a Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT.

O Programa Nacional de Controle de Qualidade foi auditado por dois dias seguidos e, em 17 de março, foi recebida a comunicação oficial de sua aprovação como empresa certificada pelas normas NBR/ISO 9002.

A SBAC e o PNCQ sentem-se orgulhosos com esta certificação que propiciará benefícios para os associados que poderão em qualquer momento afirmar que o seu programa Externo de Qualidade conta com uma empresa com qualificação validada por um órgão certificador do INMETRO, a ABNT.

Consultores Científicos

Bioquímica

Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Frederico Guilherme Schneider (RS), Prof. Marcelo Quintão Mendes (MG)

Citologia

Prof. Ely Chaves (PB), Prof^a Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Prof. Sebastião Ferreira Marinho (AM), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)

Controle de Qualidade

Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luís Fernando Barcelos (RS)

Hematologia

Dr. Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

Micologia

Prof. Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Microbiologia

Dr. Antônio Márcio Lopes (MG), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ)

Imunologia

Prof. Moisés Abraham Fuks (RJ), Prof. Paulo Jaconi Saraiva (RS)

Parasitologia

Dr. Antônio Pedro Soares (MG), Prof. Paulo S. Minami (SP)

Indexação: LILACS - Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde

Diretor Responsável

Prof. Mateus Mandu de Souza

Vice-Diretor

Prof. João Ciribelli Guimarães

Este periódico é o órgão oficial da SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS - SBAC, e destinado à divulgação de trabalhos científicos, observações pessoais, informações de interesse geral em defesa da classe dos que militam no ramo das análises clínicas, constituindo elo de união dos profissionais e fonte de estímulo na aquisição de conhecimentos que melhor os capacitem no desempenho da profissão, em benefício da comunidade.

Assinatura anual: Exterior US\$ 60.



SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Filiada à: IFCC – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
COLABIOCLI – Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Rua Vicente Licínio, 95 - Tel.: (021) 264-4449 – Fax: (021) 204-0245 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-340
<http://www.mls.com.br/med/sbac> / e-mail: sbac@mls.com.br

Diretoria

Presidente

Dr. Humberto Marques Tibúrcio

Vice-Presidente

Dr. Willy Carlos Jung

Secretário Geral

Dr^a Virginia Frota de Matos

Secretário

Dr^a Elvira Maria Loureiro Colnago

Tesoureiro

Dr. Estevão José Colnago

Tesoureiro Adjunto

Dr. Nadilson da Silva Cunha

Membros do Conselho Fiscal

Titulares: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Prof. Antônio José Marques D'Almeida (RS), Prof. José Ronaldo Cardoso (MG). – **Suplentes:** Prof. Darci Araújo Correia (CE), Prof. Carlos Adalberto Camargo Sannazzaro (SP) e Prof. Carlos Henrique Ubatuba Lienert (RS).

Comissão de Normas e Habilitação

Coordenação: Dr^a Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)
Membros: Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Prof. Durval Mazzei Nogueira (SP), Prof. Darci Araújo Correia (CE), Dr. Estevão José Colnago (RJ).

Diretor de Cursos

Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Comissão Social

Dr^a Virginia Frota de Matos (RJ)

Comissão de Relacionamento

Universitário: Prof. Jorge Fernando Teixeira Soares, Prof^a Maria Helena Braga, Prof. Paulo Minami (SP).

IFCC: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG).
COLABIOCLI: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abol Corrêa (RJ).
MERCOSUL: Dr. Álvaro Largura (PR).

Governamental: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ).

Comissão de Avaliação do Programa Nacional de Controle de Qualidade

Coordenação: Dr. José Abol Corrêa (RJ).
Membros: Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr^a Thais Lisboa Machado (RJ), Dr^a Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ).

Comissão de Congressos

Coordenação: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG).
Membros: Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Álvaro Largura (PR), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. Willy Carlos Jung (SC).

Informativo da SBAC

Coordenação: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG).
Membros: Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Antonio Jaguaribe Neto (RJ), Dr^a Virginia Frota de Matos (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC).

Conselho Deliberativo - 1997

Membros Natos: Dr. Ney Haushahn (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Evanyr Seabra Nogueira (RJ), Prof. Ediláudio Luna de Carvalho (PB), Prof. Antônio José Marques D'Almeida (RS), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ).

Regionais da Sociedade

Bahia - Presidente: Dr. Josemar Fonseca da Silva; **Ceará - Presidente:** Dr. Manoel Alves Maia Filho; **Distrito Federal - Presidente:** Dr. Manoel Aureliano Junior; **Goiás - Presidente:** Dr. Elias José Cury Júnior; **Minas Gerais - Presidente:** Dr. Vanderley Eustáquio Machado; **Paraná - Presidente:** Dr. Julio Cezar Merlim; **Pernambuco - Presidente:** Dr. Tarcísio de Oliveira Moura; **Rio Grande do Norte - Presidente:** Prof^a Gerusa Maria Caldas Maia; **Rio Grande do Sul - Presidente:** Dr. Irineu Keiserman Grinberg.

Delegados da Sociedade

Alagoas: Dr. José Pereira Mendes Júnior; **Amazonas:** Prof. Sebastião Ferreira Marinho; **Espírito Santo:** Dr. Henrique Tommasi Neto; **Maranhão:** Prof^a Rita Maria do Amparo Bacelar Palhano; **Mato Grosso:** Dr. Jerônimo Lopes de Aquino; **Mato Grosso do Sul:** Dr^a. Lenilde Brandão Arão; **Santa Catarina:** Dr. Willy Carlos Jung; **São Paulo:** Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro; **Sergipe:** Dr^a Maria da Conceição de Lucena Oliveira.

Utilização do antígeno prostático específico (PSA livre/total), como marcador tumoral no diagnóstico de câncer de próstata e hiperplasia benigna prostática

Use of PSA (free and total) as tumoral marker in the diagnosis of prostate cancer and prostatic benign hypertrophy

Isabel Cristina R. Araújo Cardoso; Maria das Graças Alves Benfica; Chequer Buffe Chamone; Getislaine França de Castro & Klívia Borges Peixoto

RESUMO - No Brasil, calcula-se que um em cada dez homens vá desenvolver um quadro histológico de hiperplasia benigna prostática (HBP) ou um carcinoma prostático (CaP). Estimativas recentes indicam que o CaP é a 3ª causa de óbitos entre todos os tipos de neoplasias, e que, após os 75 anos de idade, esses índices atingem 1º lugar. O Ministério da Saúde, já incluiu o CaP como problema de Saúde Pública. Considera-se que, se fossem feitos exames preventivos, cerca de 10.000 mortes ao ano, seriam evitadas, no Brasil. Essa alta letalidade se deve ao fato de que a doença não apresenta sintomas nos estágios iniciais, quando seria mais facilmente tratável. O PSA é uma glicoproteína produzida pelo tecido prostático (benigno ou maligno, assim como em metástases). Tal característica permite defini-lo como o mais importante marcador tumoral de CaP. No presente estudo, foram realizadas determinações dos níveis séricos de PSA Livre e Total em 630 pacientes do sexo masculino, provenientes do SAMOC/FUNED e hospitais conveniados com as Diretorias Regionais de Saúde de Minas Gerais e Sistema Único de Saúde de Minas Gerais. Os pacientes selecionados foram distribuídos inicialmente em 06 grupos, de acordo com a faixa etária: 30-40 anos (13/630), 41-50 anos (76/630), 51-60 anos (82/630), 61-70 anos (89/630), acima de 70 anos (68/630) e sem informação (302/630). Desses, 89,5%, apresentaram PSA Total até 4 ng/ml; 8,5%, na faixa de 4-10 ng/ml e em 2% dos casos, PSA Total superior a 10 ng/ml. Objetivando triar os pacientes "suspeitos" (66/630) quanto à relação PSA Livre/Total, utilizou-se o valor de corte de 18%. Em 41% (27/66) deles, a razão PSA L/T foi superior a 18% (sugestiva de HBP) e em 59% (39/66) obteve-se relação PSA L/T inferior a 18% (indicativo de CaP). A maior incidência de casos com PSA Total superior a 10 ng/ml foi observada na faixa etária entre 61-70 anos. A utilização do PSA (Livre e Total) tem obtido êxito na indicação diagnóstica (CaP e HBP) e início precoce do tratamento.

UNITERMOS - Câncer prostático, hiperplasia prostática, antígeno prostático específico.

SUMMARY - In Brazil, it is estimated that one in every ten males will develop a histological signs of Prostatic Benign Hypertrophy (PBH) or Prostate Carcinoma (PC). Recent estimates indicate that PC is the 3rd cause of death among all cancerous types. However, this index reaches the first ranking after 75 years old males. The PC is considered a public health problem by the Health Ministry. Thus if preventive exams were made, 10.000 deaths per year would be avoided in Brazil. This high percentual of deaths is elucidated by absence of symptoms in the initial state of the disease, when it would be treated easily. The PSA is a glycoprotein produced by prostatic tissue (benign or malign, as well as in metastasis). This characteristic define it as the most important PC tumoral marker. In the present study, determinations of the seric levels of Free and Total PSA were carried out on 630 males by SAMOC/FUNED and associated hospitals with Health Regional Managements of Minas Gerais and Sistema Único de Saúde (SUS/MG). The selected patients were initially distributed in six groups in agreement with the age group: 30-40 years old (13/630), 41-50 years old (76/630), 51-60 years old (82/630), 61-70 years old (89/630), above de 70 years old (68/630) and without information (302/630). 89.5% of patients presented PSA Total until 4 ng/ml; 8.5% between 4-10 ng/ml and in 2% of the cases PSA Total more than 10 ng/ml. Aiming to identify the "suspicious patients" (66/630) with relationship PSA Free/Total was used the cut off 18%. In 41% (27/66), the relationship was more than 18% (PBH suggestive) and in 59% (39/66) the relationship PSA Free/Total was inferior to 18% (PC indicative). The largest cases of incidence with PSA Total more than 10 ng/ml was observed in the age group between 61-70 years old. The use of PSA (Free and Total) has been obtaining success in the diagnosis indication (PC and PBH) and premature treatment.

UNITERMS - Prostate cancer, prostatic benign hipertrophy, prostatic specific antigen.

INTRODUÇÃO

A pesar das tecnologias de ponta e de todo o arsenal terapêutico disponível, o homem contemporâneo

ainda luta para debelar as neoplasias, que continuam sendo a primeira causa de óbitos em todo o mundo.

A busca e aperfeiçoamento de metodologias diagnósticas que permitam a detecção precoce do carcino-

Recebido em 16/02/2000

Aprovado em 21/02/2000

Fundação Ezequiel Dias/Instituto Octávio Magalhães/Divisão de Biologia Médica/Serviço de Metabolismo - Belo Horizonte/Minas Gerais - Brasil
Apoio: Imunotec Diagnóstica e EG&G Wallac

ma prostático (CaP) tem sido uma das áreas mais emergentes no diagnóstico oncológico e da área de Análises Clínicas ligada à Saúde Pública. A utilização de técnicas de marcadores tumorais tem obtido êxito no diagnóstico, possibilitando início imediato do tratamento adequado, ampliando assim, o tempo de sobrevivência, e, sobretudo trazendo melhoria da qualidade de vida e até mesmo à cura.

No Brasil, calcula-se que um em cada dez homens, vá desenvolver um quadro histológico de hiperplasia benigna de próstata (HBP) ou CaP.^{1,9}

Estimativas recentes indicam que o CaP é a terceira causa de óbitos entre todos os tipos de neoplasias e que, no sexo masculino, após os 75 anos, esses índices atingem o primeiro lugar.^{2,3,4}

O Ministério da Saúde do Brasil, já o classifica como um problema de Saúde Pública. Se fossem realizados exames preventivos, cerca de 10.000 mortes, ao ano, seriam evitadas, no Brasil.

A etiologia do câncer de próstata tem sido motivo de inúmeros estudos. Sabe-se hoje, que o progredir da idade, os níveis elevados de testosterona, dieta rica em gorduras de origem animal e hereditariedade, representam fatores de risco importantes para o desenvolvimento desta patologia.^{5,13}

A incidência de CaP varia geograficamente, sendo mais baixa em países do Extremo Oriente. Na China, a estimativa de novos casos por ano é de 0,8/100.000 habitantes. As neoplasias de próstata são raras antes dos 50 anos, observando-se aumento progressivo com a idade.^{5,12}

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, 184.000 homens foram diagnosticados com CaP nos EUA em 1998, destes 58% foram diagnosticados em estágio localizado *in situ*. Contudo, cerca de 39.000 deles vão falecer, em decorrência dessa patologia, devido à presença de metástases.⁷

Essas altas estimativas de óbitos se devem ao fato de que o CaP não apresenta sintomas nos estágios iniciais, quando seria mais facilmente tratável.^{2,7}

A evolução dos pacientes com carcinoma prostático depende de algumas variáveis, tais como, o grau histológico do tumor, o estágio da doença no momento do diagnóstico e o volume tumoral.^{5,7}

Do ponto de vista histológico, as neoplasias prostáticas são atualmente classificadas em função do grau diferenciado celular e distorção glandular. O Sistema de Gleason é o mais utilizado, no momento, e seu resultado é dado em escalas que variam de 2 a 10.

Segundo Prado⁵, a disseminação do processo neoplásico prostático se faz por via linfática, com envolvimento seqüencial dos linfonodos ilíacos e periaórticos ou por via hematogênica, com acometimento principal do esqueleto axial (coluna, bacia, crânio e costelas).

As metástases destes tumores podem surgir até 12 anos após o diagnóstico da doença, de forma que, a cura só pode ser considerada após transcorrer esse período.

Um aspecto interessante a se observar, é que alguns pacientes mais idosos e com pequenos tumores, permanecem com a doença em estado assintomático, sem progressão local e sem metástases, mesmo na ausência de qualquer tratamento.^{5,7,9}

• O antígeno prostático específico

Desde 1960, descreveu-se a produção de anticorpos contra um ou mais antígenos do tecido prostático.⁶

Os estudos de biologia molecular do PSA iniciaram-se em 1971, quando se reconheceu um componente específico do líquido seminal humano, cujo gen estava localizado no braço longo do cromossomo 19.^{3,6,4,10}

Em 1979, esse componente foi denominado de Antígeno Prostático Específico (PSA)³. Papsidero e colaboradores⁴ foram os pioneiros em publicar, em 1981, a relação existente entre níveis séricos de PSA elevados e o carcinoma prostático.

O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples, derivada do epitélio prostático e secretada no líquido seminal. Concentrações mínimas de PSA são encontradas também nas glândulas para-uretrais, endométrio humano e células tumorais mamárias.^{3,10,11,12}

O PSA tem sido empregado, eficazmente, como marcador tumoral de CaP, como também para monitoração terapêutica de pacientes portadores de neoplasia prostática. Determinações séricas de PSA, após prostatectomia radical, indicam resíduos de tecido prostático ou metástases. Conseqüentemente, aumentos gradativos dos níveis de PSA revelam recorrência da doença.^{2,3,4,6,8}

O PSA pode ser utilizado também em programas de *Screening* de CaP, em populações selecionadas de homens, assintomáticos e com idades superiores a 50 anos, possibilitando o diagnóstico precoce, a nível populacional.⁶

A elevação das concentrações séricas do PSA Total, no entanto, não oferece conclusão diagnóstica, visto que, além do CaP, outras patologias benignas da próstata podem causar aumentos dos valores de PSA Total, como a prostatite e hiperplasia benigna prostática (HBP).

Atualmente são conhecidas duas formas de PSA no soro: Livre (aproximadamente 10%) e Complexada com α_1 - Antiquimiotripsina (cerca de 90%). O PSA Total representa a somatória das duas formas. Avanços metodológicos recentes evidenciam que pacientes portadores de patologias prostáticas benignas apresentam uma proporção maior da forma Livre do PSA em relação ao PSA Total, enquanto que em pacientes com CaP, há maiores proporções da forma Complexada a ACT (PSA - ACT) em relação ao PSA Total. A razão PSA Livre/PSA Total é portanto, maior nos casos de HBP do que no CaP. O emprego de técnicas que identifiquem essas relações entre as formas de PSA, tem reduzido significativamente o número de resultados falso-positivos para CaP, evitando-se experiências de ultra-sonografia e biópsias desnecessárias e dispendiosas, além de poupar o paciente de um efeito emocional depressivo, causado por um diagnóstico errôneo.^{3,10}

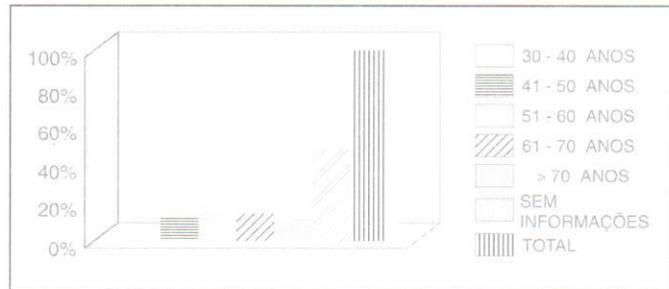
• Objetivos

1. Realização de dosagens séricas do PSA Livre e Total em pacientes do sexo masculino selecionados.
2. Avaliação dos níveis séricos de PSA Total, de acordo com diferentes faixas etárias.
3. Estabelecer uma análise dos pacientes "suspeitos" de CaP (valores de referência de 4 a 10 ng/ml e

TABELA 1 - Distribuição dos pacientes por faixa etária

FAIXA ETÁRIA	NÚMERO	PERCENTAGEM
30 - 40 ANOS	13	2%
41 - 50 ANOS	76	12%
51 - 60 ANOS	82	13%
61 - 70 ANOS	89	14%
> 70 ANOS	68	11%
SEM INFORMAÇÕES	302	48%
TOTAL	630	100%

Fonte: Livro de Registros do Serviço de Metabolismo/DBM/IOM/FUNED

GRÁFICO I

superior a 10 ng/ml) com relação à razão PSA Livre/PSA Total.

4. Avaliação da aplicação da metodologia de dupla marcação PSA Livre/PSA Total como marcador tumoral.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro foram coletadas por punção venosa (sistema Vacutainer), separadas e congeladas até o processamento das mesmas.

Recomendações foram feitas a fim de se evitar manipulações prostáticas prévias ao exame.

Foram selecionadas para o presente estudo, 630 pacientes do sexo masculino, com idades variando de 30 a superior a 70 anos, provenientes do Serviço de Medicina Ocupacional (SAMOC) - Fundação Ezequiel Dias e de hospitais e ambulatórios conveniados com as Diretorias Regionais de Saúde de Minas Gerais e Sistema Único de Saúde. Tais pacientes foram inicialmente distribuídos em seis grupos, segundo a faixa etária:

- | | |
|------------------|------------------------|
| A - 30 a 40 anos | D - 61 a 70 anos |
| B - 41 a 50 anos | E - Superior a 70 anos |
| C - 51 a 60 anos | F - Sem informação |

As determinações dos níveis séricos de PSA foram realizadas, utilizando-se o Sistema Automático Imunofluorimétrico - Auto Delfia e os kits "Prostatus PSA Free/Total - Dual Label", procedentes da Wallac - Finlândia.

A metodologia empregada (imunofluorimétrica) baseia-se na técnica "sanduíche", na qual três anticorpos monoclonais (derivados de ratos) são utilizados. Os padrões, controles e amostras dos pacientes, contendo o PSA Livre e Complexado a ACT são também ligados a anticorpos monoclonais específicos para ambas as formas de PSA (Livre e PSA - ACT).

Anticorpos marcados com Europium são direcionados contra um sítio antigênico acessível apenas para o PSA Livre, reagindo na fase sólida. Simultaneamente, anticorpos marcados com Samarium reagem contra sítios antigênicos comuns a ambos PSA (Livre e Complexado), reagindo equimolarmente com ligações ao PSA Livre e PSA - ACT.

Utilizando-se uma solução de *Enhancement*, ocorre a dissociação dos íons Europium e Samarium dos anticorpos marcados, presentes na solução, formando quelatos altamente fluorescentes. A fluorescência promovida pelo Europium é proporcional à concentração do PSA Livre da amostra e a fluorescência do Sama-

rium é proporcional à soma das concentrações do PSA Livre e Complexado, perfazendo o PSA Total. Os resultados são emitidos simultaneamente, assim como a relação Livre/Total.²

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 e o Gráfico I, mostram a distribuição 630 pacientes selecionados de acordo com a faixa etária. A maior incidência de casos com PSA Total superior a 10 ng/ml foi observada na faixa etária entre 61 a 70 anos de idade, enquanto que valores de PSA Total de 4 a 10 ng/ml foram observadas em maior número na faixa etária entre 51 a 60 anos. Ressaltamos que a grande maioria das amostras recebidas (48%), não vinham acompanhadas dos prontuários médicos devidamente preenchidos com dados a respeito da idade dos pacientes, o que prejudicou a análise final desses resultados.

Diversos autores são unânimes em afirmar que níveis séricos de PSA Total inferiores a 4 ng/ml, em pacientes com toque prostático normal, acompanham-se de riscos desprezíveis de presença de câncer na próstata, o que permite que esses casos sejam apenas seguidos clinicamente^{3,4,5,6,7,13}. Os dados obtidos no presente trabalho revelam que 89,5% dos pacientes analisados (564/630) apresentaram níveis séricos de PSA Total inferiores a 4 ng/ml (aparentemente saudáveis).

Conforme revelam a Tabela 2 e o Gráfico II, 2% dos pacientes (13/630) mostraram concentrações de PSA Total superiores a 10 ng/ml, evidenciando-se a chance de existir neoplasia prostática, sendo indicadas, nesses casos, as biópsias e se necessário, intervenção cirúrgica e tratamento químico e radioterápico.

Entretanto, em 8,5% (53/630) observaram-se concentrações de PSA Total na faixa de 4 ng/ml a 10 ng/ml (zona cinzenta). Srougi¹³ relata que nesses casos, o risco de se identificar um câncer de próstata é de 25% e que a biópsia ofereceria 75% de resultados negativos. O emprego da relação entre o PSA Livre e PSA Total nestes pacientes, seria uma ferramenta viável, a fim de se diferenciar o CaP da HBP.

Com a finalidade de se ampliar a análise de dados, além dos 53 pacientes com teores de PSA Total na "zona cinzenta", somamos os 13 homens que apresentaram valores de PSA Total superiores a 10 ng/ml, perfazendo um total de 66 pacientes "suspeitos", dos quais foi avaliada a razão PSA Livre/PSA Total, considerando-se o valor de corte de 18%.

TABELA 2
Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de PSA Total e a faixa etária

P S A	30 - 40		41 - 50		51 - 60		61 - 70		> 70		Idade não Informada		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Até 4 ng/ml	13	2	76	12	69	11	78	12	56	9	272	43	564	89,5
4 - 10 ng/ml	-	-	-	-	13	2	7	1	10	1,6	23	4	53	8,5
> 10 ng/ml	-	-	-	-	-	-	4	0,6	2	0,4	7	1	13	2
Total	13	2	76	12	82	13	89	14	68	11	302	48	630	100

TABELA 3
Avaliação das Relações entre PSA Livre/PSA Total, permitindo diferenciações de Carcinoma Prostático e Hiperplasia Benigna Prostática

	n	%
PSA L/T > 18%	27	41
PSA L/T < 18%	39	59
TOTAL	66	100

Fonte: Livro de Registros do Serviço de Metabolismo/DBM/IOM/FUNED

Pode-se averiguar na Tabela 3 que em 41% dos homens "suspeitos" (27/66) a razão PSA Livre/PSA Total foi superior a 18%, sugestiva de HBP. Contudo, em 59% (39/66) destes, obteve-se a relação PSA Livre/PSA Total inferior a 18%, indicativa de carcinoma. (Gráfico III)

Se apenas o PSA Total fosse avaliado, 66 dos pacientes analisados com valores de PSA superiores a 4 ng/ml seriam "suspeitos" para CaP. Com a razão PSA Livre/Total, os pacientes com PSA Total entre 4-10 ng/ml e com relação Livre/Total superior a 18% (HBP) deverão receber acompanhamento clínico e laboratorial a cada 6 meses, enquanto que aqueles com PSA Total superior a 10 ng/ml, que apresentaram relação Livre/Total inferior a 18% (CaP), se submeterão a exames de ultra-sonografia, biópsia e caso necessário, prostatectomia radical, com monitoração dos níveis séricos de PSA.

Os resultados obtidos foram relativamente concordantes com os encontrados na literatura consultada^{1,2,3,13} e nos permitem futuras perspectivas de ampliação deste trabalho com a análise da sensibilidade, especificidade e valores preditivos do método utilizado.

CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos no presente estudo, nossos resultados confirmaram os de outros autores^{1,3,4,6,8,10,13}, ressaltando-se que uma conclusão direta para o diagnóstico de Carcinoma Prostático não pode se fundamentar apenas em determinações de exame de PSA Total, exame digital-retal ou ultra-sonografia transretal.

A avaliação das relações entre PSA Livre/Total constatou a diferenciação do CaP da Hiperplasia Benigna Prostática, permitindo indicar o Imunoteste PSA Livre/Total de Dupla Marcação (Auto DELFIA - Wallac) como marcador tumoral. A utilização de marcadores tumorais tem contribuído significativamente no diagnóstico e monitoração terapêutica de pacientes portadores de neoplasias prostáticas.

GRÁFICO II

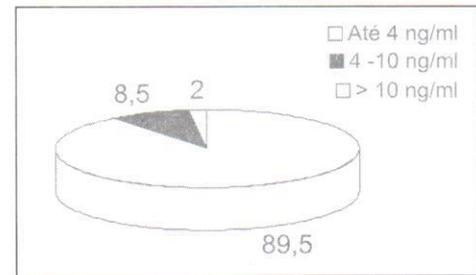
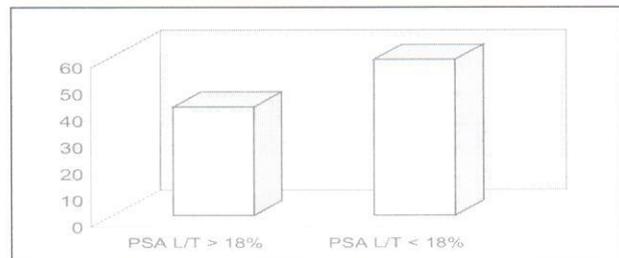


GRÁFICO III



AGRADECIMENTOS

Agradecemos aqueles que colaboraram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho: Ana Cláudia Braga A. Santos, pela digitação e diagramatização; Dr. João Luiz Pires Berto - Serviço Médico Ocupacional/FUNED, pelo apoio clínico e diagnóstico; Dra. Lídia Maria de Andrade, pela revisão e tradução; Equipe técnica do Serviço de Metabolismo e Serviço de Medicina Ocupacional/FUNED; Prof^a. Marinêz Oliveira Sousa, pela análise, revisão e crítica construtiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Souza, I. P. *et al.* Perfil de PSA em pacientes que fazem rotina laboratorial no Laboratório de Patologia Dr. Edilson Gurgel. *News Lab.* 29: vol. 1, 1998 - p.98-104.
- Delfia Prostatas PSA Free/Total. *Pontos-Chaves, Clínicos e Técnicos.* EG&G Wallac (Informe Publicitário).
- Dio, R.D; Barbério, J.C; Pradal, M.G; Menezes, A.M.S. Antígeno Prostático Específico. PSA: Recentes Avanços Clínicos e Metodológicos. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 27 (4) 137-138, 1998.
- Christensson, A. *et al.* Serum Prostate Specific Antigen Complexed to α 1 - Antichymo-trypsin as an indicator of Prostate Cancer. *The Journal of Urology.* Vol. 150, 100-105, 1993.
- Prado, F.C. *Atualização Terapêutica.* p. 1099-1107, 1997.
- Armbruster, D. A. Prostate-Specific Antigen: Biochemistry, Analytical Methods and Clinical Application. *Clin.Chem.* 39 (2), 181-195, 1993.
- Câncer de Próstata, Hiperplasia Benigna, Tratamento do Câncer de Próstata Progressivo. *Uro News*, setembro/98, <http://www.uronews.org.br>.
- Stenman, U.H. *et al.* A complex between Prostate-Specific Antigen and α 1 - Antichymo-trypsin: Is the Major Form of Prostate-Specific Antigen in Serum of Patients with Prostatic Cancer: Assay of the Complex Improves Clinical Sensitivity for Cancer. *Cancer Research* 51, 222-226, 1991.
- A Praga do Homem. *Rev. Veja* 29(3), 84, 1996.
- Prestigiacomo, A.F; Stamey, T.A. Clinical usefulness of free and complexed PSA. *Clin. Lab. Invest.* 195; 55: Suppl. 221:32-34.
- Henttu P, Vihko P. Prostatic-Specific Antigen and Human Glandular Kallikrein: Two Kalli-Kreius of the Human Prostate. *Ann. Med.* 1994;26:157-164.
- Zhang, W.M; Leiononem, J. Kalknen N; Dowell, B; Steman, U.H. Purification and Characterization of Different Molecular Forms of Prostate-Specific Antigen in Human Seminal Fluid. *Clin.Chem.* 1995; 41/11:1567-1573.
- Srougi, M. Simon. Câncer da Próstata. In: *Câncer Urológico.* São Paulo. Editora Platiná; p.281-359.1996.

Endereço para correspondência

Isabel Cristina Rossiter de Araújo Cardoso
Fundação Ezequiel Dias/Serviço de Metabolismo
Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Bairro Gameleira - 30510-010
Belo Horizonte, MG. - Brasil - Telefone: 31 371-9482 - Fax: 31 371-9480
e-mail: belcris@funed.mg.gov.br

Tipagem HLA-classe II de pacientes portadores de *Diabetes mellitus* insulino-dependentes*

Class-II HLA typing of patients with *Diabetes mellitus* insulin-dependent

Maria Inês de Moura Campos Pardini¹; Paula de Oliveira Montandon Hokama²;
Elenice Deffune³ & Paulo Eduardo de Abreu Machado¹

RESUMO - Uma forte associação entre Diabetes Melitus Insulino Dependente (Insulin Dependent Diabetes Mellitus - IDDM) e certos antígenos do complexo HLA (Human Leucocytes Antigens- Antígenos Leucocitários Humanos), tem sido descrita em várias populações. Numerosos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de avaliar a susceptibilidade genética ao IDDM, sugerindo que o envolvimento do complexo HLA é de suma importância, mesmo que outros genes (ainda desconhecidos) também desempenhem importante papel no desenvolvimento da doença. Progressos na área de Biologia Molecular permitiram análises estabelecendo que em caucasianos a susceptibilidade está associada com os haplótipos DRB1*03 - DQA1*0501 - DQB1*0201 e DRB1*04 - DQA1*0301 - DQB1*0302 enquanto que os haplótipos DRB1*1501 - DQA1*0102 - DQB1*0602 são altamente protetores. Os objetivos deste trabalho foram realizar a tipagem HLA por métodos de Biologia Molecular, dos locos DRB1, DQA1 e DQB1 de 23 pacientes portadores de Diabetes Melitus Insulino-Dependente, para avaliar a presença de alelos que pudessem conferir susceptibilidade à doença. A metodologia utilizada foi SSO-PCR, padronizada para o 12th International Histocompatibility Workshop (1996). A tipagem HLA dos alelos DRB1*, DQA1* e DQB1*, permitiu a análise parcial desses locos, visto que a tipagem completa ficou prejudicada em alguns casos por dificuldades na interpretação dos resultados, ou por variações dos sinais emitidos pelas sondas de oligonucleotídeos. Mesmo não tendo sido possível detectar todos os locos em questão, os resultados revelaram que os pacientes possuíam locos dos haplótipos que predispõem à IDDM, destacando o papel do Laboratório de Análises Clínicas na definição de susceptibilidades genéticas à certas doenças.

PALAVRAS-CHAVE - Diabetes Melitus Insulino-Dependente (DMID); HLA Classe II; tipagem HLA; Biologia Molecular; PCR-SSO.

SUMMARY - A strong association between IDDM genes (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus) and HLA (Human Leucocyte Antigens) has been reported in several populations. A lot of researches have been conducted aiming to evaluate the genetic susceptibility for IDDM suggesting that the HLA complex is the most important even if other unknown genes have an influence in disease development. Progress in Molecular Biology area have allowed analysis which established that in caucasians, susceptibility for IDDM is associated with DRB1*03 - DQA1*0501 - DQB1*0201 and DRB1*04 - DQA1*0301 - DQB1*0302 haplotypes, whereas the DRB1*1501 - DQA1*0102 - DQB1*0602 haplotype is strongly protective. The objectives of this work were to type HLA by Molecular Biology methods of DRB1*, DQA1* and DQB1* loci of 23 patients with IDDM to evaluate the susceptibility haplotypes presence. Used methodology was SSO-PCR according to 12th International Histocompatibility Workshop (1996). Just partial results were observed for it was very difficult the typing interpretation or variation in the probe signaling. Although it was not possible to detect all presented loci, the results showed the patients had some of the susceptibility haplotypes loci. It is important to emphasize the role of Clinical Analysis Laboratory in defining the genetic susceptibility to specific diseases.

KEY WORDS - Diabetes Mellitus Insulin-Dependent (IDDM); Class II-HLA; HLA-typing; Molecular Biology; SSO-PCR.

INTRODUÇÃO

A primeira demonstração experimental que o *Diabetes mellitus* insulino-dependente (Insulin Dependent Diabetes Mellitus - IDDM) é uma doença

auto-imune data de 1974 (Nerup *et al.*, 1974). Atualmente tem sido definida como um síndrome auto-imune resultante da destruição das células β pancreáticas por linfócitos T auto-reativos (Rossini *et al.*, 1993; Bach, 1994).

Recebido em 26/01/2000

Aprovado em 01/02/2000

* Vencedor do Prêmio BioSystem, XXVI CBAC, Goiânia-GO, 1999

¹Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP

²Pós-graduanda do Departamento de Clínica Médica, Nível Doutorado, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP.

³Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP

Trabalho realizado no Hemocentro, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP

Desde que Amiel, em 1967, demonstrou que uma doença (Doença de Hodgkin) parecia estar associada a indivíduos portadores de certos antígenos HLA, muitas outras associações desse tipo vêm sendo estabelecidas (12^o *International Histocompatibility Workshop*). Uma forte associação entre IDDM e certos antígenos do complexo HLA, tem sido descrita em várias populações (Dorman, 1992).

Numerosos trabalhos vem sendo realizados no sentido de avaliar a susceptibilidade genética ao IDDM, sugerindo que o envolvimento do complexo HLA é de suma importância, mesmo que outros genes (ainda desconhecidos) também desempenhem importante papel no desenvolvimento da doença (Davies *et al.*, 1994).

Progressos na área de Biologia Molecular permitiram análises que estabeleceram associações entre alelos que predis põem e outros que protegem no desenvolvimento do IDDM (Thorsby, 1995).

O 12th *International Histocompatibility Workshop*, realizado em St. Malo, França em 1996, definiu que em caucasianos a susceptibilidade está associada com os haplótipos:

DRB1*03
DQA1*0501
DQB1*0201
DRB1*04
DQA1*0301
DQB1*0302,

enquanto que os haplótipos,

DRB1*1501
DQA1*0102
DQB1*0602

são altamente protetores (Caillat-Zucman, 1997).

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram o de realizar a tipagem HLA por métodos de Biologia Molecular, dos locos DRB1, DQA1 e DQB1 de pacientes portadores de Diabetes Melitus Insulino-Dependente, para avaliar a presença de alelos que pudessem conferir susceptibilidade à doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 23 pacientes portadores de Diabetes Melitus Insulino-Dependente, cujo diagnóstico foi realizado de acordo com os critérios da NDDG (*National Diabetes Data Group*), com idade variando de 1 a 24 anos, com 87% abaixo de 15 anos, 15 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, provenientes das cidades de Bauru, Cafelândia, Lins e São Paulo, os quais após esclarecimento, consentiram livremente em participar da pesquisa.

A metodologia utilizada foi SSO-PCR, padronizada para o 12th *International Histocompatibility Workshop* (1996), a qual consiste nos seguintes passos:

• Extração do DNA

Realizada a partir de 5 mL de sangue periférico anticoagulado com EDTA pelo método *salting-out* que não utiliza fenol-clorofórmio.

• Amplificação do loco 3DRB1*

Foi realizada a partir de 200 µg de DNA em 100 µL de solução contendo 20 mM de Tris-HCL (pH8,4); 1,5mM de MgCl₂; 200 mM de dNTP; 2,5 U de Taq DNA polimerase e 25 pM de cada um dos seguintes *primers*:

DRB-GRH46: 5' CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG 3'
2DRAMP-B:5' CCGCTGCACTGTGAAGCTCT 3'

A reação constou de 35 ciclos de amplificação, em termociclador Perkin-Elmer 2400. A temperatura de desnaturação foi de 94°C, a de anelamento 50°C, e a de extensão 72°C com duração de um minuto cada etapa. Precedendo o início dos ciclos, as amostras foram incubadas a 94°C por 10 minutos e a extensão final foi mantida por 10 minutos. O produto da reação de amplificação foi visualizado em gel de agarose 1,4% após corrida eletroforética horizontal em TEB 1X e possui 292 pares de base.

• Amplificação do loco DQA1*

Realizada da mesma maneira que o anterior, apenas com o anelamento a 55°C e os seguintes *primers*:

2DQA-AMP-A 5' ATGGTGTAACCTTGACCAGT 3'
2DQA-AMP-B 5' TTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG 3'

• Amplificação do loco DQB1*

Idem ao anterior, com temperatura de anelamento em 59°C e os seguintes *primers*:

2DQB-AMP-A: 5' CATGTGCTACTTCACCAACGG 3'
2DQB-AMP-B: 5' CTGGTAGTTGTGTCTCCAACGG 3'

• Transferência para membrana de nylon (slot blot)

O fragmento amplificado foi transferido a vácuo e em meio neutro para uma membrana de náilon carregada positivamente. Ao fim da transferência, a membrana foi exposta a uma solução altamente alcalina (NaOH 0,4N) para a desnaturação das fitas do amplicon. Após seca em temperatura ambiente, a membrana foi colocada em estufa a uma temperatura de 80°C durante uma hora para a completa fixação do DNA.

• **Hibridização com oligonucleotídeos**

A hibridização das membranas foi realizada em condições de alta estrigência. Cada membrana foi previamente umedecida com SSPE 4X, foi colocada em tampão de hibridização contendo 50mM de Tris-HCl (pH8,0), 3M de TMAC (cloreto de tetrametilamônio), 2mM de EDTA, SDS 0,1%, solução de Denhart 5X, 100µg/mL de DNA de esperma de salmão na proporção de 0,15ml/cm² de membrana. Colocadas em caixas plásticas, cada membrana foi submetida a pré-hibridização, em banho-maria com agitação a 54°C durante 30 minutos, rigorosamente. Em seguida, acrescentou-se diretamente à solução, um oligonucleotídeo (sonda) marcado com digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) para cada membrana na concentração de 25pmol/10ml de tampão e a membrana permaneceu em banho-maria a 54°C por uma hora, no mínimo. Foi utilizado um conjunto de vinte e cinco sondas para tipagem do loco DRB1* de cada paciente, 19 para o loco DQA1* e 21 para o loco DQB1*, desenhadas para o XII International Histocompatibility Workshop.

• **Lavagem e detecção**

As membranas foram lavadas por duas vezes durante 15 minutos, à temperatura ambiente em solução

de SSPE 2X e SDS 0,1%. Uma última lavagem com 50mM de Tris-HCl (pH8,0), SDS 0,1%, 2mM de EDTA, 3m de TMAC foi realizada a 58°C por mais 15 minutos, assegurando a retirada do excesso de sonda. A detecção foi realizada utilizando substrato quimioluminescente (Lumigen PPD, Boehringer Mannheim). Os resultados positivos (*slots*) foram visualizados após 10 a 30 minutos de exposição em temperatura ambiente, da membrana em filme de raio X (Fuji Medical X-ray film UM-MA HC). Para a segurança do experimento, foi inserido na etapa de amplificação um controle negativo onde o DNA foi substituído por água estéril e na etapa de hibridização um conjunto de alelos previamente conhecidos foram selecionados para serem os controles positivos.

RESULTADOS

A tipagem HLA dos locos DRB1*, DQA1* e DQB1* pela técnica de SSO-PCR, permitiu a análise parcial desses pacientes, visto que a tipagem completa ficou prejudicada em alguns casos por dificuldades na interpretação dos resultados, ou por variações do sinal emitido pelas sondas de oligonucleotídeos. Mesmo com resultados parciais, os alelos de interesse, puderam ser identificados (Tabela 1).

TABELA 1
Resultados da tipagem dos locos DRB1*, DQA1* e DQB1* de 23 pacientes portadores de IDDM

Pacientes	Haplótipos que conferem susceptibilidade ao IDDM						Haplótipos que conferem resistência ao IDDM		
	DRB1*03	DQA1*0501	DQB1*0201	DRB1*04	DQA1*0301	DQB1*0302	DRB1*1501	DQA1*0102	DQB1*0602
1							+		+
2							+		+
3						+			
4				+					
5		+							
6	+	+	+						
7			+	+	+				
8	+		+						
9				+					
10					+	+			
11	+								
12	+	+	+						
13				+	+	+			
14				+	+				
15				+	+				
16			+						
17	+	+	+	+	+				
18	+		+						
19				+	+	+			
20	+		+	+	+				
21	+	+							
22	+	+	+						
23	+	+	+						

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

A metodologia SSO-PCR, utilizada para a tipagem HLA dos locos DRB1*, DQA1*, DQB1*, foi considerada extremamente laboriosa, de subjetiva interpretação, que limita sua utilização apenas para grandes centros, com uma demanda que justifique uma tipagem que utiliza hibridizações com diferentes sondas, uma a uma.

As diferenças de intensidade de sinal das sondas, requerem padronização do tempo de exposição de cada uma delas e da comparação com o controle negativo, que muitas vezes tem um *background* semelhante ao sinal positivo de outras sondas mais fracas.

Mesmo não tendo sido possível detectar todos os locos em questão, os resultados revelaram que os pacientes possuíam alelos dos haplótipos que predispõem à IDDM.

Duas pacientes, gêmeas idênticas foram as únicas a apresentar um haplótipo totalmente distinto daqueles que predispõe à IDDM (DRB1*03 - DQA1*0501 - DQB1*0201 e DRB1*04 - DQA1*0301 - DQB1*0302). Na realidade, a presença dos locos DRB1*1501 e DQB1*0301 e DQB1*0602 que foram tipados nessas pacientes, são descritos como altamente protetores (Caillat-Zucman, 1997). Talvez por esse fato, as pacientes até o momento da realização da tipagem HLA estivessem apresentando o período denominado "lua de mel" especialmente prolongado.

Os pacientes 17 e 20 apresentam associação dos alelos DRB1*03 e DRB1*04, o que confere uma susceptibilidade maior que esses alelos em separados.

Dessa forma, fica evidente a importância da tipagem HLA para corroborar os achados clínicos e auxiliar no diagnóstico definitivo da IDDM.

Os grandes progressos no desenvolvimento de técnicas de Biologia Molecular cada vez mais simples como o SSP-PCR, com menos etapas de manipulação, envolvendo menor número de variáveis vêm sendo desenvolvidas por diferentes firmas especializadas. A recente utilização de *kits* especializados em tipagens HLA, confere aos laboratórios de pequeno e médio por-

te, a possibilidade de oferecerem o esse tipo de serviço, utilizando estrutura relativamente simples e com uma homogeneidade de resultados que elimina a subjetividade das interpretações.

Sem dúvida nenhuma, com o avanço da tecnologia do DNA, o Laboratório de Análises Clínicas assume um papel cada vez maior na Medicina, não apenas confirmando hipóteses diagnósticas, como definindo susceptibilidades para que medidas preventivas possam diminuir os riscos ou talvez eliminar o aparecimento das doenças.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Elza Araújo Torres pelo fornecimento das amostras de sangue dos pacientes que fizeram parte deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amiel, J.C. (1967). Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: *Histocompatibility testing*. Copenhagen: Munksgaard, 1967, pp79-81.
2. Bach, J.F. (1994). Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Reviews*, 15:516-542.
3. Caillat-Zucman, S.; Djilali-Saiah, I.; Timsit, J., *et al.* (1997). Insulin dependent Diabetes Mellitus (IDDM): 12th International Histocompatibility Workshop study. In *Genetic diversity of HLA*, p. 389-398.
4. Davies, J.L.; Kawaguchi, Y.; Bennett, S. T.; Copeman, J.B. *et al.* (1994). A genome-wide search for human type I diabetes susceptibility genes. *Nature*, 371:130-136.
5. Dorman, J.S. (1992) Genetic Epidemiology of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: International Comparisons Usin Molecular Genetics. *Annals of Medicine*, 24:393-399.
6. Nerup, J.; Andersen, O.O.; Bendixen, G.; Egeberg, J.; Poulsen, S.E. (1971). Antipancreatic cellular hypersensitivity In Diabetes Mellitus. *Diabetes*.
7. Rossini, A. A.; Greomer, D.L.; Friedman H.P. and Mordes J.P. (1993). Immunopathogenesis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Reviews*, 1:43-75.
8. Thorsby, E. (1995) HLA-Associated Disease Susceptibility - Wich Genes Are Primarily Involve? *The Immunologist*, 3(2): 51- 58.

Endereço para correspondência:

Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Hemocentro de Botucatu
Distrito de Rubião Júnior s/n
18618-000 Botucatu, SP
e-mail: pardini@laser.com.br

Saiba o que é preciso para ter o seu

Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

Durante o XXVII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, que será realizado entre os dias 18 e 22 de junho de 2000, em Recife, a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas vai estar mais uma vez aplicando as provas para a concessão do Título de Especialista em Análises Clínicas, outorgado pela entidade.

Entre em contato através dos tel/fax (21)264-4449 e (21)204-0245 ou através do e-mail: geral@sbac.org.br, e conheça as normas do regulamento para a concessão desse título.

Infecção pelo Papiloma Vírus Humano: correlação cito-histológica e avaliação dos sinais citológicos não clássicos*

Human papillomavirus infection: cyto-histologic correlation and analysis of the non classic cytologic signs

Lara Verônica De Araújo Lopes¹ & Paula Ávila Fernandes²

RESUMO - Foram avaliados 55 esfregaços citológicos e respectivas biópsias cervicais de 55 pacientes, no período compreendido entre janeiro e julho de 1997 em laboratório de Belo Horizonte. Foi estabelecida a correlação cito-histológica e avaliada a frequência de 4 sinais "não clássicos" da infecção pelo HPV. A infecção pelo HPV foi diagnosticada na biópsia cervical em 69% dos casos, havendo concordância com o diagnóstico citológico em 21,8% dos casos. A sensibilidade do exame citológico foi de 31,5% e a especificidade de 100%. Os sinais não clássicos estudados mostraram-se associados à infecção pelo HPV. A bi ou multinucleação foi o sinal que apresentou maior sensibilidade (69,2%), enquanto que os sinais: coilocitose leve, disqueratose leve e clareamento do citoplasma, mostraram alta especificidade (88,2%, 88,0%, 70,6%, respectivamente). O uso desses sinais no diagnóstico dessa infecção deve ser limitado, tendo em vista a baixa sensibilidade encontrada para cada sinal. A avaliação da representatividade da amostra dos esfregaços demonstrou que os casos verdadeiramente positivos para a infecção pelo HPV apresentaram células da junção escamo-colunar em alta porcentagem (83,3%), enquanto que nos casos falso-negativos, essa porcentagem foi de 46%.

UNITERMOS - HPV, neoplasia intra-epitelial cervical, citologia cervical.

SUMMARY - Fifty-five cytologic smears and 55 cervical biopsies were evaluated from January - July of 1997 in a pathology laboratory of Belo Horizonte. Cyto-histologic correlation and the frequency of four nonclassic cytologic signs of the human papillomavirus infection were determined. The histopathologic diagnosis of human papillomavirus infection was made in 69% of the cases, with a concordant cytologic diagnosis in 21.8% of the cases. The sensitivity of Papanicolaou smears was 31.5% and the specificity was 100%. Non classic cytologic signs were associated with the human papillomavirus infection. Binucleation and multinucleation presented higher sensitivity (69.2%), where as the signs mild koilocytosis, mild dyskeratocytosis and cleared cytoplasm presented high specificity. The use of these signs should be limited, in view of the low sensitivity presented for each sign. The analysis of specimen adequacy shows that true positive cases for human papillomavirus infection presented cells of escamo-column junction in high percentage (83.3%), while in false-negative cases the percentage was 46%.

KEY WORDS - HPV, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cytology.

INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos têm enfatizado a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) como fator pre-disponente na gênese do carcinoma do colo uterino (Gissmann, 1989; Schneider *et al.*, 1987,). Desde então, é grande a preocupação com a detecção precoce desta infecção através do exame colposcópico. A associação de coilocitos e disqueratose tem sido conside-

rada achado patognomônico para o diagnóstico citológico da infecção pelo HPV (Drake *et al.*, 1987). No entanto, com a utilização desses sinais, a frequência de detecção desta infecção através do esfregaço citológico é baixa, em torno de 2% (Schneider *et al.*, 1987; Krebs, 1989; Schneider, 1989). São diversos os fatores que podem estar relacionados com resultados citológicos falso-negativos, tais como erro de interpretação pelo citopatologista e amostra inadequada do esfregaço

Recebido em 19/11/99

Aprovado em 30/11/99

*Trabalho realizado no Laboratório Análys - Belo Horizonte - MG e na Disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

¹Farmacêutica-Bioquímica, especialista em Citopatologia - Laboratório Análys

²Professora da Disciplina de Citologia Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia -UFMG

(Pairwuti, 1990). Gay *et al.* (1984) realizaram estudo mostrando que 62% dos exames citológicos falso-negativos estavam relacionados com amostras inadequadas, desprovidas de células representativas da junção escamo-colunar. Em relação à infecção por HPV, devido ao grande número de falso-negativos nos exames citológicos, alguns autores propuseram a utilização de sinais citológicos denominados "não clássicos" para ampliar o número de casos de infecção pelo HPV diagnosticados pela citologia. Esses sinais foram descritos por Schneider *et al.* (1987) e compreendem: coilocitose leve, disqueratose leve, clareamento do citoplasma, bi ou multinucleação, presença de grânulos de ceratohialina, condensação de filamentos, hiperchromatismo nuclear e presença de halo perinuclear.

Com o objetivo de conhecer melhor os fatores associados com os resultados citológicos falso-negativos no nosso meio, avaliamos no presente trabalho a correlação cito-histológica para o diagnóstico da infecção pelo HPV, levando em consideração a representatividade da amostra dos esfregaços. Verificamos ainda a frequência de quatro sinais citológicos não clássicos em pacientes com e sem infecção por HPV, diagnosticada através da biópsia cervical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados retrospectivamente esfregaços e biópsias cervicais colhidos simultaneamente de 55 pacientes, em laboratório de grande porte de Belo Horizonte, no período compreendido entre janeiro e julho de 1997. Na primeira etapa do trabalho, procedeu-se ao levantamento dos diagnósticos cito e histopatológicos, os quais foram registrados para o estabelecimento da concordância cito-histológica. Foram anotados também a idade das pacientes e os informes clínicos presentes nas requisições.

Para avaliação dos sinais citológicos não clássicos da infecção pelo HPV, selecionou-se dentre os 55 exames inicialmente levantados, dois grupos de pacientes com esfregaços negativos para infecção pelo HPV com as seguintes características:

Grupo I (casos): constituído por 26 pacientes com diagnóstico de infecção por HPV na biópsia cervical e esfregaços citológicos negativos;

TABELA 2
Frequência dos sinais citológicos não clássicos em esfregaços cervicais negativos de 43 pacientes com e sem infecção pelo HPV

Sinais não clássicos	Biópsias positivas para HPV (n=26)		Biópsias negativas para HPV (n=17)	
	nº de casos	%	nº de casos	%
coilocitose leve	10	38	2	12
disqueratose leve	6	23	2	12
bi ou multinucleação	18	69	8	47
clareamento do citoplasma	10	38	5	29

Grupo II (controles): formado por 17 pacientes cujos exames histopatológicos e citológicos não mostraram infecção por HPV. Os esfregaços cervicais dos dois grupos foram revistos e examinados quanto à presença de 4 sinais não clássicos da infecção HPV descritos por Schneider *et al.* (1987). Os sinais avaliados foram coilocitose leve, disqueratose leve, bi ou multinucleação e clareamento do citoplasma. Os critérios utilizados para a identificação de cada um desses sinais foram os mesmos estabelecidos pelos autores. Determinou-se a sensibilidade e especificidade de cada sinal citológico não clássico. Os esfregaços citológicos foram revisados por um único observador, sem o conhecimento do resultado da biópsia correspondente. Os diagnósticos histopatológicos não foram revisados. Em todos os esfregaços, a presença ou não de células endocervicais e/ou metaplásicas foi anotada, com a finalidade de avaliar a representatividade da amostra.

RESULTADOS

• Correlação cito-histológica

A maioria dos casos nos quais a infecção pelo HPV foi detectada, tanto na biópsia como na citologia, mostrava associação com alterações displásicas de grau leve. Dos 43 esfregaços negativos para o HPV, 26 (60,5%) foram positivos para essa infecção na biópsia e 17 (39,5%) negativos (Tabela 1). A infecção pelo HPV foi diagnosticada na biópsia em 38 (69%) casos, havendo concordância com o diagnóstico citológico em apenas 12 casos (21,8%). A concordância global entre

TABELA 1
Correlação cito-histológica no diagnóstico de HPV em 55 pacientes

Diagnósticos citológicos	Diagnósticos histopatológicos		
	HPV	Cervicite	Total
HPV	12	0	12
Negativos	26	17	43
Total	38	17	55

TABELA 3
Sensibilidade e especificidade dos sinais citológicos não clássicos da infecção pelo HPV

Sinais não clássicos	Sensibilidade	Especificidade
coilocitose leve	38,5%	88,2%
disqueratose leve	22,0%	88,0%
bi ou multinucleação	69,2%	53,00%
clareamento do citoplasma	38,5%	70,6%

as duas técnicas foi de 52,7% (29 casos). Nenhum caso falso-positivo foi constatado, enquanto que os falso-negativos representaram 26 (47,2%) dos casos.

A sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivo e negativo, e a acurácia do exame citológico na detecção da infecção por HPV foram respectivamente 31,5%, 100%, 100%, 39,5% e 52,7%.

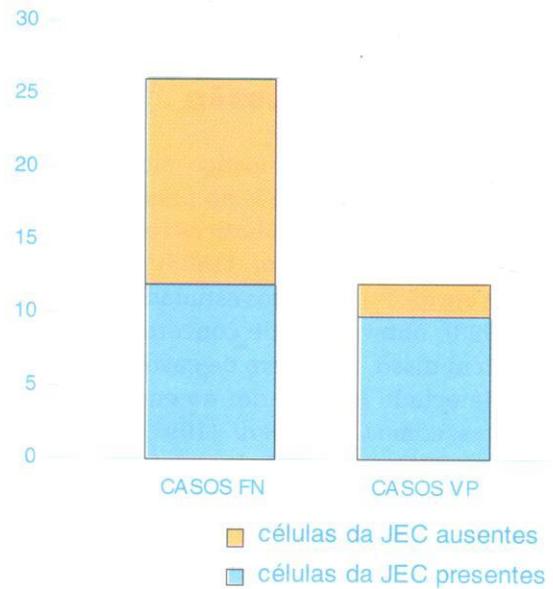
• **Avaliação dos sinais não clássicos da infecção pelo HPV**

A Tabela 2 mostra a frequência dos sinais não clássicos presentes em esfregaços negativos de pacientes com e sem infecção pelo HPV detectada na biópsia. A bi ou multinucleação foi o achado mais frequente nos casos com biópsias negativa e positiva para a infecção pelo HPV. A coilocitose leve, seguida da disceratose leve, foram mais frequentes nas pacientes com diagnóstico histopatológico do HPV. A sensibilidade e especificidade de cada sinal não clássico estão registrados na Tabela 3. A Fig. I ilustra estes sinais.

• **Avaliação da representatividade da amostra dos esfregaços**

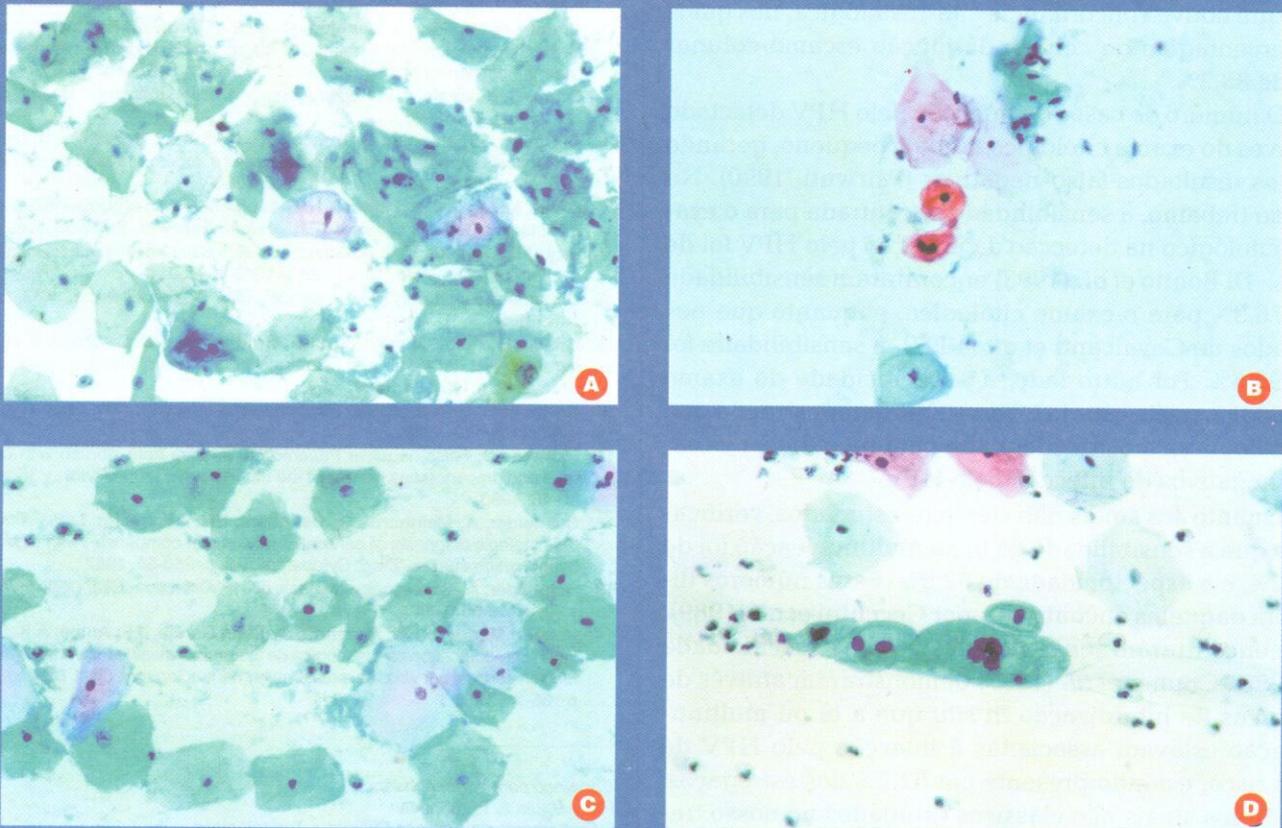
A representatividade da amostra dos esfregaços está demonstrada no Gráfico A.

GRÁFICO A
Número de casos com e sem diagnóstico citológico de infecção por HPV segundo a adequação da amostra



JEC= Junção Escamo Colunar
FN= Falso Negativo
VP= Verdadeiramente Positivo

FIGURA I



Fotomicrografias de esfregaços cervicais apresentando células com coilocitose leve (A), disceratose leve (B), clareamento do citoplasma (C) e multinucleação (D). Coloração de Papanicolaou, 450x.

Dos 26 casos negativos para a infecção pelo HPV na citologia e que apresentavam biópsias positivas (casos falso-negativos), 12 (46%) apresentavam células da junção escamo-colunar. Dos 12 casos em que houve concordância cito-histológica (casos verdadeiramente positivos), 10 (83,3%) apresentavam células da junção escamo-colunar.

DISCUSSÃO

A concordância no diagnóstico cito e histopatológico para a infecção pelo HPV no presente trabalho foi baixa (21,8%) e inferior aos índices relatados na literatura. Von Der Menden *et al.* (1995) observaram concordância em 59,1% dos casos estudados, enquanto que Crum (1993), obteve 50% de concordância cito-histológica. Além disso, o número de casos falso-negativos (47,2%) detectado foi superior ao encontrado por outros autores, como Gitsch *et al.* (1991) e Von Der Menden *et al.* (1995), cujos trabalhos referem, respectivamente, 21,7% e 22,3% dos casos representados por biópsias positivas para HPV e esfregaços cervicais negativos. A discrepância dos nossos dados com os da literatura poderia estar relacionada com a representatividade das amostras estudadas. Quando analisamos a representatividade da amostra dos esfregaços nesse estudo, observamos que os casos falso-negativos apresentavam células da junção escamo-colunar em pequena percentagem (46%), em comparação com os casos em que houve concordância cito-histológica, nos quais a percentagem de células da junção escamo-colunar foi de 83,3%.

O número de casos de infecção pelo HPV detectado através do exame citológico ainda é pequeno, gerando vários resultados falso-negativos (Pairwuti, 1990). No nosso trabalho, a sensibilidade encontrada para o exame citológico na detecção da infecção pelo HPV foi de 32%. Di Bonito *et al.* (1993) encontraram sensibilidade de 76,3% para o exame citológico, enquanto que nos estudos de Cavalcanti *et al.* (1997), a sensibilidade foi de 97,6%. Por outro lado, a especificidade do exame citológico neste estudo foi de 100%, demonstrando que a citologia se mostra adequada para reconhecer os casos negativos de infecção pelo HPV.

Quanto aos sinais não clássicos estudados, verificamos que a sensibilidade da bi ou multinucleação foi de 69,2%, e a especificidade de 52,9%. Esses números diferem daqueles encontrados por Cecchini *et al.* (1989), que encontraram sensibilidade de 7% e especificidade de 99%. Cramer *et al.* (1997) demonstraram através de técnicas de hibridização *in situ* que a bi ou multinucleação estavam associadas à infecção pelo HPV de alto risco, estando presente em 62,8% dos esfregaços. Os outros sinais não clássicos estudados no nosso trabalho: coilocitose leve, disqueratose leve e clareamento do citoplasma, mostraram especificidade razoavelmente alta: 88,2%, 88,0%, 70,6%, respectivamente. Estes va-

lores são semelhantes aos descritos por Cecchini *et al.* (1989). É possível que a ausência destes sinais nos esfregaços possa auxiliar a distinguir os casos verdadeiramente negativos de infecção por HPV. Cavalcanti *et al.* (1997) encontraram forte associação da coilocitose leve com o HPV de baixo risco, estando presente em 27,3% dos esfregaços. Já a disqueratose leve esteve relacionada com a infecção pelo HPV em 38,1% dos esfregaços. Esses autores concluíram que esfregaços contendo esses sinais deveriam ser introduzidos na categoria de "células escamosas atípicas de significado indeterminado", aumentando, dessa forma, o número de pacientes selecionadas para serem avaliadas por técnicas mais sensíveis.

No nosso trabalho, observamos que os "sinais não clássicos" estudados mostraram associação com a infecção pelo HPV, já que aparecem em grande número de casos que eram positivos para essa infecção. No entanto, o uso desses sinais no diagnóstico dessa infecção deve ser limitado, tendo em vista a baixa sensibilidade encontrada para cada sinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cavalcanti, S. M. B.; Zardo, L. G.; Oliveira, L. H. S. Human Papillomavirus Infection: Correlation of colposcopy, cytology, histopathology and *in situ* hybridization. *J. Bras. Patol.*, v.33, p.62-69, 1997.
2. Cecchini, S.; Confortini, M.; Bonardi, L.; Cipparrone, G.; Galante, L.; Iossa, A.; Ciatto, S. "Nonclassic" cytologic signs of cervical condyloma. *Acta Cytol.*, v.34, p.781-785, 1989.
3. Cramer, H. M.; Skinner-Wannemvehler, B. S.; Brow, D. R.; Katz, B. P.; Fife, K. H. Cytomorphologic correlates of human Papillomavirus infection in the "normal" cervico-vaginal smear. *Acta Cytol.*, v.4, p.261-268, 1997.
4. Crum, C. Koilocytosis in Pap smears: how useful a finding? *Obstet. Gynecol.*, v.38, p.66, 1993.
5. Di Bonito, L.; Falconier, G.; Tomasic, G.; Colautti, I.; Bonifacio, D.; Dudine, S. Cervical Cytopathology: an evolution of its accuracy based on cyto-histologic comparison. *Cancer*, v.72, p.3002-3006, 1993.
6. Drake, M.; Medley, G.; Mitchell, H. Cytologic detection of human Papillomavirus infection. *Obstet. Gynecol. Clin. of North Am.*, v.14, p.431-50, 1987.
7. Gay, J.D.; Donaldson, L.D.; Goellner, J.R. False negative results in cervical cytologic studies. *Acta Cytol.*, v.29, p.1043-1046, 1984.
8. Gissmann, L. Linking HPV to cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.32, p.141-146, 1989.
9. Gitsch, G.; Reinthaller, A.; Tatra, G.; Breitenecker, G. Diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and Human Papilloma virus infection. *Arch. Gynecol.*, v.249, p.179-184, 1991.
10. Krebs, H.B. Genital Human Papillomavirus Infection. *Clin. Obst. Gynecol.*, v.32, p.105-110, 1989.
11. Pairwuti, S. False-negative Papanicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol.*, v.35, n.1, p.40-46, 1990.
12. Schneider, A.; Meinhardt, G.; De-Villers, EM; Gissmann, L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with DNA-HPV hybridization studies. *Diag. Cytopathol.*, v.3, p.250-55, 1987.
13. Schneider, A. Microscopic diagnosis of HPV infection. *Clin. Obst. Gynecol.*, v.32, p.148-56, 1989.
14. Von Der Menden, J.W.; Moreno, J.A.; Leon Garcia, J.F.; Ambe, A.K. Correlation cito-colposcópica-histológica de lesiones cervicales preinvasoras e infección cervical por virus del papiloma humano. *Genecol. Obst. Mexico.*, v.63, p.365-71, 1995.

Endereço para correspondência

Profª. Paula A. Fernandes
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia da UFMG.
Av. Olegário Maciel, 2360, Bairro Lourdes,
Belo Horizonte, MG.
E-mail: paula@farmacia.ufmg.br

Avaliação da interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias

Evaluation of ascorbic acid interference in reactions for analysis of urinary glucose and hemoglobin

Edson L. da Silva¹; Flávia Martinello²; Emília R. Scharf²; Daniel M. de Luca³; Gabriela R. Amorim³; Leandro Corrad³ & Toni R. Martins³

RESUMO – O ácido ascórbico, freqüentemente ingerido como suplemento alimentar, é altamente eliminado pela urina e pode interferir nos ensaios laboratoriais que utilizam reações de óxido-redução, como por exemplo, os sistemas de reações de peroxidação usados para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias. O objetivo desse estudo foi avaliar a interferência do ácido ascórbico nessas determinações em relação à dose de vitamina C ingerida e ao tempo de coleta das amostras. Indivíduos saudáveis (n=13) consumiram doses de 0,15 a 4,0 g/dia de vitamina C e as determinações foram realizadas em urinas coletadas 4, 12, 24 e 48h após a ingestão. Quantidades crescentes de glicose e hemoglobina foram adicionadas às amostras de urina e os ensaios foram realizados com as tiras reagentes Rapignost e Multistix. Os resultados demonstraram que ocorreram interferências significativas nas amostras de 4 e 12 h, inclusive com as menores doses de vitamina C e, embora em menor grau, também nas amostras de 24 e 48h após a ingestão de 2 e 4g de vitamina C. A tira reagente Multistix foi ligeiramente mais resistente. Para prevenir resultados falso-negativos, sugerimos a suspensão da ingestão de altas doses de vitamina C, 72h antes da coleta da amostra para a realização do exame de urina.

PALAVRAS-CHAVE – Ácido ascórbico; interferência; tiras reagentes; glicose urinária; hemoglobina urinária.

SUMMARY – Ascorbic acid, widely ingested as a dietary supplement and rapidly excreted in the urine, interferes in the laboratory assays with peroxidase redox systems, such as used in reagent-strip tests for urinary glucose and hemoglobin. The aim of this study was to verify the ascorbic acid interference on such dipstick analysis in relation to the dose level of vitamin C consumed and the time period of urine collection. Healthy volunteers (n=13) took 0.15 to 4.0g of vitamin C daily and the analysis were done with specimens collected at 4, 12, 24, and 48h after ingestion. Increasing amounts of glucose and hemoglobin were added into the urine specimens and were assayed by using Rapignost and Multistix reagent strips. Results showed that significant interference occurred in the specimens of 4 and 12 h, even with the lowest vitamin C dose level examined. Although in lower degree, interferences could also be found in urine specimens containing small amounts of glucose and hemoglobin obtained 24 and 48h after ingestion of 2 and 4g vitamin C. Multistix reagent strip was slightly more resistant. To prevent false-negative results, we suggest that intake of high doses of vitamin C should be avoided at least 72h before collection of the specimens for urinalysis.

KEY WORDS – Ascorbic acid interference; dipsticks; urinary glucose; urinary hemoglobin.

INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico, normalmente conhecido como vitamina C, tem sido altamente consumido como suplemento alimentar como forma de prevenir ou combater resfriados, doenças cardiovasculares e neoplasias, possivelmente pelo seu elevado poder antioxidante. Calcula-se que aproximadamente 25% da população adul-

ta norte-americana e até 40% das crianças fazem uso diário de suplemento vitamínico, sendo a vitamina C o principal componente nesses suplementos^{12,14}. A absorção da vitamina C ocorre, predominantemente, no intestino delgado e é igualmente distribuída em vários tecidos do organismo sem que seja armazenada em um órgão específico. Quando os níveis teciduais encontram-se saturados, o nível plasmático eleva-se e o excesso de

Recebido em 29/6/99

Aprovado em 08/7/99

Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

Apoio Financeiro: FUNPESQUISA - UFSC

¹Prof. Adjunto de Bioquímica Clínica

²Alunas de Iniciação Científica (CNPq-PIBIC) do Curso de Farmácia

³Alunos do Curso de Farmácia, Habilitação Análises Clínicas

vitamina é facilmente excretado através dos rins, devido o baixo limiar de excreção renal do ácido ascórbico^{7,9}. Assim, como consequência da suplementação vitamínica, estima-se que seja elevada a incidência de concentrações significativas de ácido ascórbico na urina, o qual pode provocar sérias implicações na rotina de urinálise. Bridgen *et al.*¹ demonstraram que 23% da população de pacientes ambulatoriais analisada na cidade de Vitória, Canadá, apresentaram níveis de ácido ascórbico urinário iguais ou superiores a 2,12 mmol/l (37 mg/dl), sugerindo assim, que a presença de níveis elevados de ácido ascórbico urinário é mais comum do que se imagina, provavelmente devido à suplementação vitamínica.

Sabe-se há longo tempo que os ensaios laboratoriais realizados pelas tiras reagentes para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias, que envolvem o sistema indicador oxidase/peroxidase, estão sujeitos à interferência pelo ácido ascórbico^{1,5,16}. Os fabricantes de tiras reagentes têm introduzido uma série de modificações para minimizar essa interferência, no entanto o problema parece ainda persistir, conforme demonstrado recentemente em estudo *in vitro* realizado por Rodrigues *et al.*¹⁰. Nesse sentido, é importante avaliar a real gravidade desse fenômeno, principalmente em relação às doses de vitamina C ingeridas e ao tempo de coleta das amostras para a análise. Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar determinações de glicose e hemoglobina urinárias em amostras coletadas em diferentes períodos de tempo após a ingestão de sucessivas e crescentes doses de vitamina C. Nossos resultados demonstraram significativas interferências do ácido ascórbico urinário nas amostras coletadas nas primeiras 12h após a ingestão de vitamina C, inclusive com as menores doses analisadas e, com concentrações maiores de vitamina C, o efeito persistiu por até 24 e 48h.

MATERIAIS E MÉTODOS

• Materiais

A vitamina C, comercializada na forma de comprimidos efervescentes ou em gotas, Redoxon® (Roche), foi adquirida nas farmácias e drogarias. Para as determinações urinárias foram utilizadas as tiras reagentes Rapignostic Total-Screen (Behring) e Multistix 10SG (Bayer). O ácido ascórbico e o ácido metafosfórico foram obtidos da Merck. Os demais reagentes utilizados, ácido sulfúrico, glicose, 2,4-dinitrofenil-hidrazina, tiouréia, sulfato de cobre e cloreto de sódio foram de marcas nacionais.

• Protocolo experimental

Treze voluntários considerados saudáveis pela equipe médica do HU-UFSC, consumiram diariamente, por via oral, doses sucessivas de 150, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg de vitamina C. Cada dose foi ingerida de forma única após a última refeição do dia, por 7 dias consecutivos com intervalo de 3 dias entre cada dose. As amostras de urina foram coletadas na manhã do 8º dia, 12-13h após a ingestão da vitamina C. Após a coleta de urina, os indivíduos ingeriram uma última dose de vitamina C e amostras subsequentes de urina foram co-

letadas após 4, 24 e 48h. Durante a ingestão das doses inferiores a 2g foi evitado o consumo de alimentos ricos em vitamina C. As amostras de 4 e 12h são representativas do total de urina formada e naturalmente armazenada na bexiga durante esses períodos de tempo, enquanto que as amostras de 24 e 48h representam apenas o volume urinário acumulado na última noite antes da coleta. Assim, a amostra de 4h é equivalente a uma coleta de urina aleatória ao longo do dia e as demais são representativas da primeira urina da manhã.

• Detecção de glicose e hemoglobina urinárias

A interferência do ácido ascórbico urinário nas reações de glicose e hemoglobina foi avaliada utilizando-se as tiras reagentes Rapignost Total-Screen e Multistix 10SG. Todas as amostras apresentaram-se negativas para glicose e hemoglobina. Portanto, concentrações crescentes de glicose (50, 150, 350, 500, 750 e 1000 mg/dl) e hemoglobina (0,06, 0,09, 0,12, 0,60, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/dl) foram adicionadas às amostras de urina coletadas após a ingestão da vitamina C. A solução de hemoglobina foi obtida a partir de eritrócitos humanos. Após hemólise das células com solução hipotônica, o conteúdo de hemoglobina foi determinado fotometricamente pelo método do cianeto de metahemoglobina. As determinações urinárias foram realizadas dentro de 2h após a coleta (aprox 1h após a adição de glicose e hemoglobina). Ensaio adicional foram realizados com a mesma amostra após repouso de 6h a 4°C. O grau de interferência foi verificado pela comparação com amostras de urina controle, obtidas de indivíduos que não estavam consumindo suplemento vitamínico. Essas urinas apresentaram-se negativas para o ácido ascórbico pela tira Rapignost T-S. Todas as leituras foram efetuadas por um mesmo analista para evitar variações subjetivas.

• Determinação do ácido ascórbico urinário

O ácido ascórbico presente nas amostras de urina coletadas de indivíduos com e sem a suplementação oral com vitamina C foi determinado imediatamente após a coleta das urinas, utilizando-se o método espectrofotométrico da 2,4-dinitrofenil-hidrazina⁷.

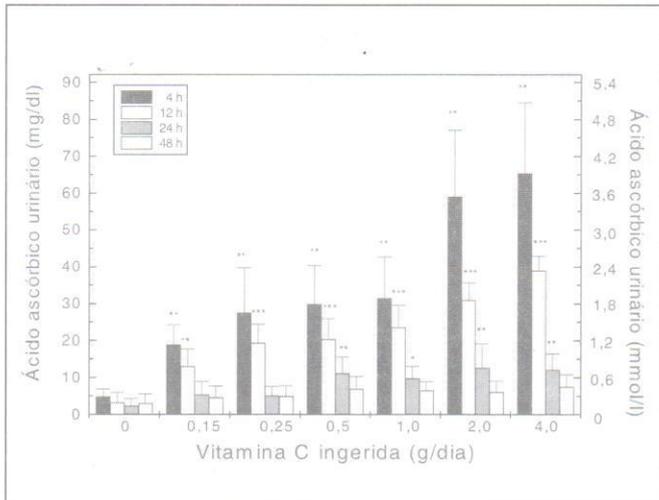
RESULTADOS

• Concentração de ácido ascórbico urinário

A Figura I mostra a relação entre a dose de vitamina C ingerida e os níveis de ácido ascórbico urinário encontrados em amostras coletadas 4, 12, 24 e 48h após a ingestão. Houve uma correlação positiva entre a dose ingerida e a concentração de ácido ascórbico nas amostras de urina de 4 e 12h ($r = 0,82$ e $0,84$, respectivamente, $p < 0,01$; correlação de Pearson). Os níveis de ácido ascórbico encontrados nas urinas de indivíduos não suplementados ou nas amostras coletadas antes da suplementação com vitamina C foram de 0,17 a 0,34 mmol/L (3-6 mg/dl). Esses valores aumentaram significativamente (aprox. 5 vezes) 4h após a suplementa-

FIGURA 1

Níveis de ácido ascórbico urinário em amostras coletadas 4, 12, 24 e 48 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado aos respectivos valores basais (Teste t pareado de Student).

TABELA 2

Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

Glicose ^b	Vitamina C ingerida (g/dia)						
	0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
	Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
	0,3±0,1	0,73±0,3	1,10±0,3	1,15±0,3	1,34±0,34	1,75±0,3	2,21±0,2
Rapignost Total-Screen							
50	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	+	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	++	+ / ++	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	++	+ / +++	(-) / Tr	Tr	Neg (-)
750	+++	+++	+++ / +++	++	Tr / +	(-) / Tr	Tr
1000	++++	++++	++++	+++ / +++	+ / +++	Tr	Tr
Multistix 10SG							
50	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	Tr / +	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	+	+	+	Tr / +	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)
500	++	++	++	+	+	Tr / +	(-) / Tr
750	+++	+++	+++	++	+ / +++	++	++
1000	++++	++++	++++	+++	+++ / +++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

ção com apenas 150 mg de vitamina C ($p < 0,01$; teste t pareado de Student). Os valores diminuíram nas amostras de 12h, mas ainda assim, permaneceram elevados em relação aos níveis basais ($p < 0,01$). Houve um aumento crescente nos níveis de ácido ascórbico urinário após a ingestão de doses maiores de vitamina C, atingindo um máximo de $3,7 \pm 1,1$ mmol/l (65 ± 19 mg/dl) com a dose de 4g de vitamina C nas amostras de 4h ($p < 0,01$). Com o consumo de 0,5 a 4,0g de vitamina C foram encontrados valores significativamente elevados de ácido ascórbico inclusive 24h após a ingestão

TABELA 1

Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

Glicose ^b	Vitamina C ingerida (g/dia)						
	0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
	Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
	0,3±0,2	1,07±0,3	1,56±0,7	1,70±0,6	1,78±0,6	3,35±1,0	3,66±1,5
Rapignost Total-Screen							
50	Traço	Neg (-)					
150	+	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	++	++	+	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	+	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)
750	+++	++	++	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)
1000	++++	++++	+++	++	+	(-) / Tr	(-) / Tr
Multistix 10SG							
50	Traço	Neg (-)					
150	Tr / +	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	+	Tr / +	Tr / +	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
500	++	++	++	++	Tr / +	Tr / +	Tr / +
750	+++	+++	+++	+++	+ / ++	+ / ++	+ / ++
1000	++++	++++	++++	++++	+++	+ / ++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 10 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

TABELA 3

Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

Glicose ^b	Vitamina C ingerida (g/dia)						
	0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
	Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
	0,16±0,1	0,3±0,2	0,29±0,1	0,64±0,2	0,56±0,18	0,71±0,4	0,69±0,2
Rapignost Total-Screen							
50	Traço	Tr	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
150	+	+	+	Tr	Tr / +	Tr / +	Tr / +
350	++	++	++	+	++	+	+ / ++
500	++	++	++	++	++	++	++
750	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Multistix 10SG							
50	Traço	Tr	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
150	Tr / +	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
350	+	+	+	+	+ / ++	+	Tr
500	++	++	++	++	++	++	++
750	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

($p < 0,01$). No entanto, todos os valores urinários diminuíram aos níveis basais 48h após a ingestão, inclusive com a maior dose de vitamina C analisada.

• Interferência nas reações de glicose

A ação interferente do ácido ascórbico na determinação de glicose urinária está evidenciada nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente 4, 12 e 24h após a ingestão das várias doses de vitamina C. As urinas controles apresentaram ausência de ácido ascórbico pela tira reagente Rapignost T-S e $0,33 \pm 0,17$ mmol/l ($5,8 \pm 3$ mg/dl)

TABELA 4

Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/dia)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Hemog. ^b		Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
		0,3±0,2	1,07±0,3	1,56±0,7	1,70±0,6	1,78±0,6	3,35±1,0	3,66±1,5
Rapignost Total-Screen								
0,06	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	(-) / Tr	Neg (-)					
0,60	++	Tr / +	(-) / Tr	Neg (-)				
2,0	++	+	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
4,0	++	+ / ++	+	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
6,0	+++	++	+ / ++	+	Tr	Tr	Tr	Tr
Multistix 10SG								
0,06	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	++	+	+	Tr / +	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,6	++	++	++	+ / ++	(-) / Tr	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
4,0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 10 indivíduos.
^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

pelo método espectrofotométrico. As quantidades de glicose adicionadas nessas amostras foram detectadas a nível de traço, 1+, 2+, 3+ e 4+. Quando as determinações foram realizadas com as amostras obtidas 4h após a ingestão de 150 mg de vitamina C observou-se uma inibição nas reações correspondentes a traço e 1+ (Tabela 1). Com a ingestão de doses maiores de vitamina C, e a conseqüente elevação nos níveis de ácido ascórbico urinário, o grau de interferência aumentou, chegando a um máximo de completa inibição da reação de 4+ de glicose após a ingestão de 2g de vitamina C pela tira Rapignost T-S. Com a tira reagente Multistix 10SG a detecção foi completamente abolida quando baixas concentrações de glicose estavam presentes (traço e 1+) e uma reação correspondente a 3+ foi detectada como 1+ em até 50% das amostras após a ingestão de 2g de vitamina C (separação por barra representa dois diferentes resultados como maioria).

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com as amostras de 12h. A inibição das reações para a detecção de glicose foi inferior àquela observada para as amostras obtidas após 4 h, em decorrência dos menores níveis de ácido ascórbico urinário. No entanto, as interferências foram ainda significativas. Reações correspondentes a traço e 1+ de glicose foram completamente inibidas, mesmo com as menores doses de vitamina C ingeridas (150 e 250 mg). Interferência máxima foi observada com as amostras obtidas após a ingestão de 4g de vitamina C, onde uma quantidade de glicose correspondente a 2+ não foi detectada e concentrações equivalentes a 3 e 4+ resultaram em traços pela tira Rapignost e 2 e 3+ pela tira Multistix. As amostras de urina obtidas 24h após a ingestão de 0,5-4,0g de vitamina C ainda apresentaram níveis de ácido ascórbico suficientemente elevados

TABELA 5

Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/dia)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Hemog. ^b		Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
		0,3±0,1	0,73±0,3	1,10±0,3	1,15±0,3	1,34±0,34	1,75±0,3	2,21±0,2
Rapignost Total-Screen								
0,06	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
2,0	++	+ / ++	+	Tr / +	(-) / Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)
4,0	++	++	++	+	Tr	Tr	Tr	Tr
6,0	+++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+	+	Tr
Multistix 10SG								
0,06	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	++	+	+	+	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Neg (-)
0,6	+++ / ++	++	++	++	+	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	+++	+++	+++	+++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	++
4,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos.
^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

TABELA 6

Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/dia)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Hemog. ^b		Ácido ascórbico urinário (mmol/l)						
		0,2±0,1	0,3±0,2	0,29±0,1	0,64±0,2	0,56±0,18	0,71±0,4	0,69±0,2
Rapignost Total-Screen								
0,06	Traço	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	+	+	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	++	++	++	+ / ++	++	++	++	++
4,0	++	++	++	++	++	++	++	++
Multistix 10SG								
0,06	Tr	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr / +	Tr / +	Tr	Tr	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
0,12	++	+	+ / ++	Tr	Tr	Tr / +	Tr	Tr
0,6	+++ / ++	++	++	++	++	++	++	++
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.
^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dl). Tr, traço.

para inibir parcialmente as reações com baixa concentração de glicose (Tabela 3).

• Interferência nas reações de hemoglobina

Os resultados referentes à detecção de hemoglobina nas amostras contendo diferentes níveis de ácido ascórbico urinário estão expostos nas Tabelas 4, 5 e 6. As concentrações de hemoglobina adicionadas às amostras controles foram equivalentes a traço, 1+ 2+ e 3+ (0,06 mg/dl de hemoglobina (traço) corresponde a aproximadamente 20 eritrócitos/ml de urina). Na presença

TABELA 7

Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 48 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

	Vitamina C ingerida (g/dia)						
	0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Ácido ascórbico urinário (mmol/l)							
Hemog. ^b	0,16±0,1	0,26±0,1	0,3±0,1	0,4±0,2	0,37±0,13	0,35±0,2	0,4±0,2
Rapignost Total-Screen							
0,06	Traço	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	+	+	Tr	Tr	Tr	Tr
0,60	++	++	++	++	+	+	Tr
2,0	++	++	++	++	++	++	++
Multistix 10SG							
0,06	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	+	++	+ / ++	+ / ++	Tr	(-) / Tr
0,12	++	++	++	++	++	++	Tr / +
0,6	+++ / +++	+++	+++	+++	+++ / +++	++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.

^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dl).

Tr=traço.

de 19 mg/dl de ácido ascórbico urinário (amostra obtida 4h após a ingestão de 150mg de vitamina C), as tiras reagentes Rapignost T-S e Multistix 10SG mostraram uma sensível diminuição na detecção de hemoglobina correspondente a traço, 1+ e 2+ (Tabela 4). A interferência do ácido ascórbico ficou mais evidente com a ingestão de doses maiores de vitamina C. Nas doses de 2 e 4g, a tira Rapignost T-S perdeu toda a capacidade de resposta à hemoglobina urinária, apresentando apenas reação a nível de traço para a concentração de 6,0 mg/dl de hemoglobina (3+ na amostra controle). A tira reagente Multistix foi ligeiramente mais resistente ao efeito inibitório do ácido ascórbico. Com as doses de 2 e 4g de vitamina C ocorreu completa inibição da reação com 0,12 mg/dl de hemoglobina (2+ no controle) e apresentou resultado de 1+ para 2,0 mg/dl (3+).

A Tabela 5 mostra os resultados da interferência do ácido ascórbico nas amostras de urina coletadas 12h após a ingestão de vitamina C. O grau de inibição nas reações foi semelhante ao observado para as amostras de 4 h, com exceção das urinas contendo concentrações elevadas de hemoglobina (2+ e 3+), onde se observou uma menor interferência do ácido ascórbico. Com as urinas coletadas 24h após a ingestão de vitamina C ocorreu inibição significativa somente nas amostras contendo baixos níveis de hemoglobina (traço e 1+), principalmente com a tira Rapignost T-S (Tabela 6). Essa interferência persistiu inclusive nas amostras coletadas 48h após a ingestão de doses iguais ou maiores a 1,0g de vitamina C (Tabela 7).

O ácido ascórbico em amostras biológicas possui estabilidade de aproximadamente 3h⁷. Para verificar se ocorreria diminuição no grau de interferência após a auto-oxidação do ácido ascórbico, os ensaios foram repetidos com as amostras de 12h após a permanência das mesmas a 4°C por 6h. A Tabela 8 mostra que os resultados foram praticamente idênticos aos anteriormente obtidos pela análise efetuada 1-2h após a coleta das amostras.

TABELA 8

Detecção de glicose e hemoglobina urinárias na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 6 horas após a coleta das amostras^a

	Vitamina C ingerida (g/dia)						
	0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Glicose^b							
50	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	+	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	++	++	+	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	++	++	Tr	Tr	Neg (-)
750	+++	+++	+++	+++	+	Tr	Tr
1000	++++	++++	++++	++++	++	+	+
Hemoglobina^b							
0,06	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
2,0	++	+ / ++	+	+	(-) / Tr	Tr	Neg (-)
4,0	++	++	++	++	+	+	Tr
6,0	+++	+++	+++	+++	+	+	+

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos, 12 horas após a ingestão de vitamina C.

^bGlicose e hemoglobina adicionadas (concentração final em mg/dl). As determinações foram realizadas com a tira reagente Rapignost Total-Screen. Tr, traço.

DISCUSSÃO

O uso de tratamentos alternativos baseados na ingestão de vitaminas é comum para as pessoas preocupadas com a saúde. Isto é bastante conhecido para o caso de pacientes com cânceres^{2,4}, mas também se observa entre as pessoas saudáveis um consumo crescente de vitaminas, e principalmente de vitamina C, como terapia preventiva para diversos males. A estimativa em países industrializados é de que aproximadamente 25 a 40% da população faça uso de suplemento vitamínico^{1,12,14}. Como consequência, é elevada a incidência de amostras de urina com grande quantidade de ácido ascórbico, o qual interfere de forma significativa na detecção de glicose e hemoglobina mediada por reações de óxido-redução^{1,5,10,16}.

Nesse estudo delineamos um protocolo experimental baseado no consumo de várias doses de vitamina C (0,15 a 4g/d), com o objetivo de avaliar o grau de interferência do ácido ascórbico considerando o tempo de eliminação e a quantidade de vitamina C ingerida. A vitamina C suplementar foi consumida durante 7 dias consecutivos. Após esse período de tempo atingiu-se o "pool" corpóreo máximo e a consequente eliminação do excesso pela urina. Após a interrupção da ingestão suplementar de 0,15 e 0,25 g/d de vitamina C, o excesso de ácido ascórbico absorvido e acumulado foi eliminado nas primeiras 24 h, enquanto que para as doses maiores, como 0,5 a 4,0 g/d, o retorno aos níveis basais ocorreu somente após 48h (Figura I).

A concentração de ácido ascórbico presente nas amostras de urina foi suficientemente elevada para inibir as reações para a detecção de glicose e hemoglobina (Tabelas 1 a 7). O grau de interferência foi dependente da quantidade de ácido ascórbico e da concentração de glicose e hemoglobina presentes, como já fora previamente descrito por outros autores^{1,10,16}. A quantidade de ácido ascórbico

na urina foi dependente, por sua vez, da dose de vitamina C consumida e do tempo em que a amostra foi coletada após a ingestão. Assim, amostras de urina contendo pequenas quantidades de glicose e hemoglobina sofreram interferências significativas mesmo quando baixas doses de vitamina C foram ingeridas, sendo que a inibição das reações ocorreu mais intensamente, e principalmente, nas amostras coletadas 4 e 12h após a ingestão de vitamina C. É interessante observar que houve apenas uma pequena diferença no grau de interferência entre as amostras de 4 e 12h (Tabelas 1, 2, 4 e 5), possivelmente por se tratar de amostras mais concentradas que acumularam todo o ácido ascórbico urinário eliminado nesses períodos de tempo. Outro ponto a se observar é que doses de vitamina C tão baixas quanto 0,15 e 0,25 g/d provocaram interferências significativas inclusive 12h após a ingestão. Naturalmente, as doses de vitamina C maiores (0,5 a 4 g/d) inibiram as reações de glicose e hemoglobina ainda mais efetivamente, tanto em relação à inibição de reações com grande quantidade dos analitos, como também em relação à inibição em amostras coletadas 24 e 48h após a ingestão da vitamina, devido ao tempo mais prolongado de eliminação de grandes doses de ácido ascórbico. As amostras de urina coletadas 24h após a ingestão ainda continham ácido ascórbico suficiente para tornar negativas as reações a nível de traço e 1+ de glicose e hemoglobina (Tabela 3 e 6). A reação de pseudo-peroxidase da hemoglobina foi mais sensível ao efeito inibitório do ácido ascórbico do que a reação de oxidase/peroxidase (Trinder) da glicose. Por esse motivo, e devido à eliminação mais lenta do ácido em alguns indivíduos, algumas amostras de urina ainda apresentaram interferência inclusive 48h após a ingestão de altas doses de vitamina C, principalmente quando pequenas concentrações de hemoglobina estavam presentes nas amostras de urina (Tabela 7).

O ácido ascórbico em solução é pouco estável, possui uma meia-vida de aproximadamente 3-4 h7. Procuramos assim, verificar se a ação interferente do ácido ascórbico seria diminuída, pela auto-oxidação ocorrida com o decorrer do tempo transcorrido após a coleta das amostras. Ensaio realizado 6h após a permanência das amostras de urina a 4°C (Tabela 8) demonstraram que os resultados relativos à detecção de glicose e hemoglobina foram semelhantes aos obtidos 1-2h após a coleta, sugerindo assim, a necessidade de se esperar um tempo superior a 6h para evitar o efeito inibitório do ácido ascórbico. Portanto, essa nos parece ser uma medida inadequada para contornar o problema da interferência na rotina de urinálise.

Apesar de se conhecer há longo tempo a capacidade do ácido ascórbico de inibir as reações de glicose e hemoglobina urinárias e de que algumas formulações de tiras reagentes podem ser modificadas para diminuir a interferência^{1,5,13,16}, nosso trabalho demonstrou que o problema ainda persiste até os dias atuais, principalmente em amostras de indivíduos e pacientes que fazem uso de suplemento oral de vitamina C e que apresentam níveis de ácido ascórbico iguais ou maiores do que 0,57 mmol/l (10 mg/dl). A tira reagente Multistix 10SG foi ligeiramente mais resistente do que a tira Rapignost T-S (Tabelas 1 a 6). Possivelmente pelo fato dessa última indicar a presença do ácido ascórbico (1+ equivale a 0,57 mmol/l), e assim, não utilizar uma formulação de reagentes mais resistentes ao efeito inibitório do ácido. Experimentos adicionais estão sendo realizados em nosso laboratório para verificar a sensibilidade de outras tiras reagentes, bem como também, a in-

terferência nas reações de bilirrubina, nitrito e peroxidase de leucócitos.

Resultados falso-negativos, ou falsamente diminuídos, para a glicose são potencialmente prejudiciais aos pacientes diabéticos, particularmente para aqueles que fazem o controle da doença através de tiras reativas. A detecção de eritrócitos na urina é, na maioria dos casos, um achado importante, principalmente em pacientes idosos^{3,8}. A interferência provocada pelo ácido ascórbico nas reações para a hemoglobina pode, portanto, provocar sérias conseqüências para esses pacientes. As implicações para a rotina de urinálise serão ainda maiores se considerarmos o fato de que alguns laboratórios não realizam, por questões de economia, o exame microscópico da urina quando os exames físico e químico pela tira reagente fornecem resultados normais^{6,11,15}.

Alguns laboratórios preocupados com a interferência do ácido ascórbico procuram utilizar tiras reagentes que sejam mais resistentes ou que detectam a presença do ácido, como é o caso da tira Rapignost T-S. Baseados nos resultados demonstrados nesse trabalho podemos introduzir uma terceira forma de contornar o problema, qual seja, a interrupção da ingestão de vitamina C 24h antes da coleta da amostra no caso de pequenas doses (menores do que 0,5 g/d) ou 72h quando a dose ingerida for igual ou maior do que 1,0g por dia.

AGRADECIMENTOS

Programa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) e FUNPESQUISA-UFSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bridgen, M.L.; Edgell, D.; McPherson, M.; Leadbeater, A. & Hoag, G. High incidence of significant urinary ascorbic acid concentrations in a West Coast population - Implications for routine urinalysis. *Clin. Chem.*, 38(3):426-431, 1992.
2. Bridgen, M.L. Unorthodox therapy and your cancer patient. *Postgrad. Med.*, 81:271-280, 1987.
3. Britton, J.P.; Dowell, A.C. & Whelan, P. Dipstick haematuria and bladder cancer in men over 60: results of a community study. *Br. Med. J.*, 299: 1010-1012, 1989.
4. Cameron, E.; Pauling, L. & Leibovitz, B. Ascorbic acid and cancer: A review. *Cancer Res.*, 39:663-675, 1979.
5. Daae, L.N.W. & Juell, A. Ascorbic acid and test strip reactions for haematuria. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 43: 267-269, 1983.
6. High, S.R.; Rowe, J.A. & Maksem, J.A. Macroscopic physicochemical testing for screening urinalysis. *Lab. Med.*, 19:174-176, 1988.
7. McCormick, D.B. & Greene, H.L. Vitamins (Ascorbic acid). In: Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA, USA, 1994, p. 1311-1316.
8. Messing, E.M.; Young, T.B.; Hunt, V.B.; Emoto, S.E. & Wehbie, J.M. The significance of asymptomatic microhematuria in men 50 or more years old: finding of a home screening study using urinary dipsticks. *J. Urol.*, 137: 919-922, 1987.
9. Miller, S.M. Vitamins (Water-soluble vitamins). In: Bishop, M.L.; Duben-Engelkirk, J.L. & Fody, E.P. *Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations*. 3rd ed. Lippincott Com. Philadelphia, PA, USA, 1996, p. 603-607.
10. Rodrigues, E.R.; Pedrazzi, A.H.P.; Franco, J.J. & Zanardo-Filho, A. Ação interferente do ácido ascórbico no doseamento da glicose sérica e urinária e do ácido úrico sérico, "in vitro". *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 29(4): 220-222, 1997.
11. Shaw, S.T.; Poon, S.Y. & Wong, E.T. Routine urinalysis: is the dipstick enough? *J. Am. Med. Assoc.*, 253: 1596-1600, 1985.
12. Simon, J.A.; Schreiber, G.B.; Crawford, P.B. & Frederick, M.M. Dietary vitamin C and serum lipids in black and white girls. *Epidemiology*, 4: 537-541, 1993.
13. Smalley, D.L. & Bradley, M.E. New test for urinary glucose (BM 33071) evaluated. *Clin. Chem.*, 31: 90-92, 1985.
14. Subar, A.F. & Block, G. Use of vitamin and mineral supplements: Demographics and amounts of nutrients consumed. The 1987 Healthy Interview Survey. *Am. J. Epidemiol.* 132: 1091-1099, 1990.
15. Wenz, B. & Lampasso, J. A. Eliminating unnecessary urine microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 92: 78-91, 1989.
16. Zweig, M.H. & Jackson, A. Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin. *Clin. Chem.* 32(4): 674-677, 1986.

Endereço para correspondência

Edson Luiz da Silva
Departamento de Análises Clínicas, CCS
Univ. Fed. de Santa Catarina, Campus Universitário
Trindade, Florianópolis - SC - 88040-970 • E-mail: edson@ccs.ufsc.br

Antígeno prostático específico e descrição de novos marcadores para o câncer de próstata

Prostate-specific antigen and new related markers for prostate cancer

Rose Daher & Mona Beaini

RESUMO - Não obstante o antígeno prostático específico (PSA), ou calicreína 3 humana, seja o mais valioso instrumento disponível para o diagnóstico e a administração do câncer de próstata, da maneira como é atualmente utilizado ele não é sensível ou específico o suficiente para permitir o diagnóstico precoce ou o estadiamento da doença. Diversos conceitos novos vêm sendo introduzidos com a finalidade de otimizar o uso clínico das dosagens do PSA, mas todos apresentam suas desvantagens. As formas moleculares do PSA, especialmente o PSA livre, parece ser útil na detecção do câncer da próstata em concentrações que vão de 4-10 µg/l. Novas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa para a detecção de quantidades mínimas do RNA mensageiro do PSA e o antígeno prostático membrana-específico são promissores para o prognóstico e possivelmente para o estadiamento precoce do câncer prostático. Por outro lado, a calicreína 2 humana, uma protease sérica estreitamente relacionada ao PSA e que também é produzida predominantemente pela próstata, pode ser um novo marcador adjuvante do câncer prostático. Quanto às suas funções biológicas, o PSA já não pode ser considerado uma molécula específica da próstata, associada principalmente à liquefação do sêmen, tendo em vista seu possível papel de indicador prognóstico no câncer de mama feminina. A função biológica do PSA em tecidos normais e em tumores pode ser muito mais complexa do que se tem acreditado até o momento e exige investigações posteriores.

PALAVRAS-CHAVE - Antígeno prostático específico; Antígeno prostático específico livre; Antígeno prostático membrana-específico; Reação em cadeia polimerase transcriptase reversa; calicreína 2 humana.

SUMMARY - Although prostate-specific antigen (PSA), or human kallikrein 3, is the most valuable tool available for the diagnosis and management of prostate cancer, as currently used it is insufficiently sensitive and specific for early detection or staging of the malignancy. Many new concepts have been introduced in order to optimize the clinical use of PSA measurements, but each one has its own drawbacks. The molecular forms of PSA, specially the free PSA, seem to be useful for the detection of prostate cancer in men with PSA concentrations falling in the 4-10µg/l range. New molecular techniques, such as reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of minimal amounts of PSA messenger RNA and prostate-specific membrane antigen, offer new promise for the prognosis and possibly staging of prostate cancer. On the other hand, human kallikrein 2, a serine protease closely related to PSA that is also expressed predominantly in the prostate, may be a new adjuvant marker for prostate cancer. As for its biological functions, PSA can no longer be regarded as a specific prostate molecule associated mainly with semen liquefaction when it has a possible role as a prognostic indicator in female breast cancer. The biological role of PSA in normal tissues and tumors may be much more complex than previously thought and requires further investigation.

KEY WORDS - Prostate-specific antigen; Free prostate-specific antigen; Prostate-specific membrane antigen; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; human kallikrein 2.

INTRODUÇÃO

Nos Estados Unidos, o câncer prostático é o mais freqüente de todos os tipos de câncer, o responsável pela segunda maior incidência de morte por câncer e a quarta maior causa de todos os óbitos masculinos¹. O antígeno prostático específico (PSA) é o marcador tumoral mais valioso atualmente disponível para diag-

nóstico, prognóstico e acompanhamento de pacientes com câncer prostático². O PSA foi identificado no sêmen pela primeira vez em 1966, por Hara *et al.*, e caracterizado em 1978, por Sensabaugh⁴. É um glicopeptídeo de cadeia simples de 28430 Da⁵, uma protease sérica tipo calicreína^{6,7}, idêntica à calicreína 3 humana (hK3)⁸. O potencial de diagnóstico das medições do PSA é limitado pelo aumento da concentração do PSA em

Recebido em 15/02/2000

Aprovado em 21/02/2000

Seção de Química Clínica, Departamento de Patologia e Medicina de Laboratório, American University of Beirut, Beirute, Líbano

muitos pacientes com problemas benignos de próstata. Em consequência, diversas melhorias têm sido propostas para aumentar a especificidade diagnóstica nas determinações do PSA sérico: a densidade do PSA, a velocidade do PSA e os valores de referência específicos da idade^{9,10}. A introdução do PSA livre e razão do PSA livre em relação ao total (L/T), que diminui no câncer prostático e aumenta na hiperplasia prostática benigna (BPH), foi outro acréscimo valioso a essas melhorias¹⁰. Nos anos recentes, a especificidade tecidual absoluta do PSA tem sido contestada, e sua função na liquefação do sêmen não é mais a única função associada a esta molécula^{10,11}. O presente artigo faz a revisão dos avanços mais recentes com relação à utilidade analítica e clínica dos testes de PSA, as novas funções biológicas propostas para o PSA e os novos indicadores de câncer prostático.

• **Varição no PSA**

O PSA sérico é complexado com vários diferentes inibidores extra-celulares da protease, tais como a α_1 -antiquimiotripsina (ACT), o inibidor de proteína C (PCI), a α_2 -macroglobulina (A2M) e a proteína da zona gravídica. O ACT e a A2M são hepatócito-derivados e representam os principais inibidores de protease no sangue (ocorrendo em concentrações de 4 a 8 $\mu\text{mol/l}$), enquanto que o PCI e a proteína da zona gravídica estão presentes em níveis muito inferiores¹². Os níveis de PSA no soro são normalmente da ordem de 10^6 vezes menos que os níveis no ejaculado. Antes que o PSA pudesse se complexar com o ACT no soro, seria de esperar que manifestasse atividade catalítica; no entanto, a pequena fração livre no soro é desprovida de atividade catalítica. Atualmente, os testes imunológicos para PSA dosam o PSA total, a soma do PSA livre com o PSA complexado ao ACT. O PSA ligado ao A2M fica oculto¹³.

A variação das concentrações de PSA no soro poderiam ser devidas a várias causas: diferenças de idade, sexo, raça e sazonais; procedimentos de diagnóstico e variabilidades analíticas e biológicas. Essas variações são importantes para se considerar por ocasião de monitoramento dos níveis séricos de PSA. As concentrações de PSA se alteram com a idade, aumentando entre a quinta e sexta década de vida. Deste modo, para o diagnóstico de câncer da próstata, os valores de referência específicos da idade são aplicáveis até os 60 anos. Após a sétima década, a correlação entre o PSA e a idade é menos significativa¹⁴. Também foram pesquisadas as diferenças raciais no PSA. Em geral, os afro-americanos apresentam valores mais elevados de PSA do que os caucasianos^{15,16}. Foram observadas variações sazonais nos níveis de PSA; constatou-se que ocorre aumento na primavera¹⁷. Estudos anteriores haviam determinado que aumentos de 0,75 $\mu\text{g/l}$ por ano em pacientes cujo PSA era medido a intervalos de 6 meses durante até 5 anos melhorava o desempenho do diagnóstico na detecção de cânceres quando o PSA inicial era inferior a 4,0 $\mu\text{g/L}$ ¹⁸. No entanto, o grau de variabilidade biológica difere entre pacientes, de modo que

um aumento entre dois níveis consecutivos de PSA menor que 20 a 46% pode ser devido às variabilidades analítica e biológica¹⁹. Ficou demonstrado que diversos procedimentos diagnósticos causam uma elevação nos níveis do PSA sérico. A biópsia prostática ou a cirurgia podem produzir um aumento de 60 vezes acima dos valores básicos. Inclusive a massagem prostática e a ultrassonografia transretal (TRUS) podem até mesmo duplicar os valores do PSA no pré-tratamento. Catéteres colocados na uretra não resultam em qualquer alteração, clínica ou estatística significativa nos níveis de PSA²⁰. Atualmente sabe-se que o exame de toque retal (DRE) causa um aumento discreto no PSA total e no percentual do PSA livre, devido à liberação desta última forma no soro, que parece ser eliminada mais rapidamente do que o PSA complexado²¹. A ejaculação, o exercício vigoroso e a manipulação prostática não afetam significativamente as alterações nos níveis séricos de PSA no dia-a-dia^{19, 22}. Por outro lado, Zisman *et al.* encontraram um aumento significativo no PSA sérico após a ejaculação e recomendou que os pacientes se abstenham de ejacular nas 24 horas anteriores à coleta de amostra para dosagem de PSA²³. Chegaram à mesma conclusão Herschman *et al.* que relataram que o PSA continua aumentado de 6 a 24 horas após a ejaculação²⁴.

Devido à natureza da interação entre o A2M e o PSA, concentrações elevadas de A2M podem mascarar concentrações aumentadas de PSA e, por conseguinte, provocar leituras falsamente baixas de concentrações de PSA. Honda *et al.* constataram significativa correlação negativa *in vivo* entre concentrações de PSA e A2M em indivíduos em fase aguda de doença. Esta correlação sugere a possibilidade de que pacientes com elevadas concentrações séricas de A2M podem apresentar resultados falsamente baixos de concentrações de PSA²⁵.

• **Manuseio de amostras**

É muito importante o manuseio de amostras na medição de PSA livre. Woodrum *et al.* pesquisaram a estabilidade do PSA livre em amostras de soro coletadas e armazenadas em condições diversas²⁶. Eles demonstraram a ocorrência de perda de 1% de PSA livre por hora quando o soro achava-se em contato com o coágulo. As perdas eram de até 3% de PSA livre por dia de armazenagem a 4 °C ou 23 °C. Cerca de 0,9% do PSA livre era perdido por mês de armazenagem a -20 °C em comparação com cerca de 0,4% por mês de armazenagem a -70 °C. O PSA total parecia estável. Os autores sugerem que a rotina de preparação do soro e seu armazenamento sob refrigeração durante até 24 horas é aceitável para a medição do PSA livre e total. No entanto, eles advertem que as amostras destinadas a retenção por mais de 24 horas devem ser mantidas congeladas, de preferência a -70 °C. Esses resultados foram confirmados também por Pironen *et al.* que constataram que o uso de amostras de plasma aumenta a estabilidade do PSA livre²⁷. Ornstein *et al.* avaliaram a variação do PSA total, livre a razão do percentual livre

em indivíduos com idades iguais ou superiores a 50 anos através do cálculo de coeficientes de variação de três medições de PSA em amostras de sangue retiradas de cada indivíduo a intervalos de duas semanas²². Foi calculada uma variação média de aproximadamente 15% em medições do PSA total, livre e a razão do percentual livre.

• **Proporção do PSA Livre em relação ao Total (L/T)**

A utilidade da determinação do PSA total na detecção precoce do câncer é limitada porquanto muitos tumores não são detectados em um *cut-off* de 4µg/l. Da mesma forma, 25% de todos os homens com BPH apresentam PSA sérico acima de 4µg/l¹². A faixa crítica do PSA para a detecção precoce do câncer prostático é de 4,1-9,9µg/l, de vez que voluntários do sexo masculino, saudáveis, com PSA de 4µg/l ou menos somente são diagnosticados pelo DRE e homens com PSA de 10µg/l ou mais devem ser biopsiados porque 53% deles terão câncer²⁸. Há muito tempo se sabe que os ensaios de PSA comercialmente disponíveis não resultam em valores corretos e reprodutíveis de PSA^{29,30}. Entre os fatores que contribuem para esse problema incluem-se: a especificidade de anticorpos anti-PSA relativos a diferentes isoformas, a isoforma de PSA utilizada na preparação do anticorpo anti-PSA, a composição do calibrador, os valores PSA atribuídos ao calibrador e o modelo do ensaio. Por conseqüência, uma demanda maior foi direcionada para testes para PSA com sensibilidade extra, de maior precisão e exatidão, até mesmo para a faixa normal de concentração do PSA³¹. Por conseguinte, a padronização e a garantia da qualidade das medições do PSA tornaram-se objeto da atenção de diversas organizações³². A capacidade de medir o PSA em suas diferentes formas moleculares séricas, que se demonstrou fornecer informações clinicamente úteis para a diferenciação entre pacientes masculinos com BPH e pacientes com carcinoma prostático, foi muito significativa^{13,33,34}. Através da seleção cuidadosa de anticorpos monoclonais após o mapeamento do epítipo [epítipo], tem sido possível desenvolver ensaios imunológicos com potência igual para PSA e PSA-ACT^{10,35}. Tradicionalmente, o PSA livre purificado do plasma seminal era utilizado como um calibrador em diversos testes imunológicos. Recentemente, a purificação do PSA-ACT permitiu a elaboração de um calibrador com 90% de PSA-ACT e 10% de PSA livre, desse modo assemelhando-se o mais próximo possível às isoformas fisiológicas³⁶. Esse calibrador é recomendado como material de referência para padronização internacional dos ensaios imunológicos do PSA^{37,38}. Quando esse calibrador foi utilizado em nove ensaios comerciais, para substituir calibradores dos fabricantes, ele reduziu substancialmente as diferenças entre esses ensaios, especialmente na faixa de 4-10µg/l³⁸.

Mitrunen *et al.* criaram um ensaio imunofluorométrico de dupla marcação para a medição simultânea do PSA livre e total, e a partir destas a razão L/T no soro é calculada diretamente¹³. Nesse ensaio, uma fase sóli-

da de anticorpo monoclonal captura as formas livre e complexada do PSA em um modo equimolar. Um anticorpo monoclonal fluorescente marcado detecta somente o PSA livre, e um segundo anticorpo monoclonal marcado diferente fornece a detecção equimolar tanto do PSA livre quanto do PSA-ACT. Métodos anteriores determinavam a proporção de PSA-ACT para o PSA total³⁴; no entanto a razão L/T do PSA é um indicador mais sensível para a detecção do câncer prostático³⁹. Não está esclarecida a causa de existir uma maior proporção de PSA complexado com o ACT no câncer prostático do que em relação ao BPH. Contudo, já foi demonstrado que as células de tumores produzem ambos, o ACT e o PSA, na maioria dos cânceres prostáticos, proporcionando condições ideais para a formação de complexos de PSA-ACT que então entram na circulação geral. Em contraste, não há produção de ACT no epitélio glandular produtor de PSA nas áreas de BPH, e assim as condições são menos ideais para a formação de complexos, o que por sua vez facilita a entrada de uma forma livre de PSA sem atividade proteásica na circulação geral^{12,40}. Diversos outros ensaios automatizados para a medição do PSA livre foram desenvolvidos por diferentes fabricantes^{41,43}. Quando diversos métodos foram comparados, chegou-se à conclusão de que a razão L/T pode ser útil no diagnóstico diferencial de várias condições prostáticas, porém, devido à variação substancial na medição do PSA total, a zona cinzenta de diagnóstico do PSA total terá de ser avaliada em cada ensaio^{44,46}. Ao mesmo tempo, a razão L/T demonstrou-se vantajosa na discriminação entre câncer e BPH mesmo em nível baixo de 1,8µg/l⁴⁷.

Numa comparação em vários centros do desempenho do PSA livre em 1081 pacientes masculinos com valores de PSA total entre 2,5 e 20µg/l, todos com diagnóstico histológico de BPH ou câncer prostático, foi comprovado que os valores da razão L/T do PSA abaixo de 7% são muito suspeitos de câncer, enquanto que valores acima de 25% sugerem a ausência de malignidade. Embora a idade e/ou o volume prostático tenham influência sobre o nível de PSA livre no soro, eles não influenciam os *cut-off* de 7% e 25%⁴⁸. Entretanto, Oesterling *et al.* demonstraram que apesar das concentrações no soro das diferentes formas moleculares de PSA aumentarem com a idade, a proporção L/T é consistente no grupo etário total³⁹. Em outro estudo, a alteração no percentual de PSA livre foi determinada durante até 15 anos antes do diagnóstico de BPH ou câncer prostático num grupo de homens que foram acompanhados durante muitos anos no *Baltimore Longitudinal Study of Aging*. Os níveis de PSA livre e total foram medidos em amostras de soro congeladas de 26 homens sem históricos de doenças da próstata, 29 homens com diagnóstico histológico de BPH e 23 homens com câncer. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na razão L/T do PSA entre homens sem câncer e pacientes com câncer prostático com até 8 anos de antecedência ao diagnóstico clínico. Entre os três indicadores: PSA total, PSA livre e razão L/T do PSA, este último, a razão L/T do PSA, foi o marcador de soro que mais precocemente previu um diagnóstico subse-

qüente de câncer prostático, reduzindo desse modo o número de resultados falso-positivos entre homens sem câncer prostático⁴⁹. Num estudo prospectivo, Morgan *et al.* investigaram se o PSA livre poderia melhorar a especificidade do PSA e servir como um orientador clínico para evitar biópsias prostáticas repetidas em pacientes com elevações no PSA, DRE normal e biópsias anteriores negativas⁵⁰. A medição do percentual livre do PSA aumenta muito a capacidade de diferenciar entre BPH e câncer nos pacientes com elevado PSA total (acima de 4,0µg/l), DRE normal e duas prévias biópsias sextantes negativas. Além do que, um baixo percentual de PSA livre (abaixo de 10%) parece ser um forte previsor de câncer prostático nesses pacientes, mesmo após duas biópsias negativas.

Conquanto muitos estudos que avaliam os ensaios de PSA livre estão de acordo em que a razão L/T do PSA apresenta desempenho significativamente melhor do que o PSA total isoladamente⁵¹, a escolha ideal de um *cut-off* para o percentual de PSA livre deveria depender da opção do médico entre maximizar a sensibilidade ou a especificidade do ensaio⁵².

• Triagem

A fim de melhorar a taxa de detecção precoce do câncer prostático, tanto a Sociedade do Câncer Americana, assim como, a Associação Urológica Americana recomendam que as determinações anuais do PSA combinadas com o DRE devem ser adotadas para homens com 50 anos ou mais de idade^{9,10,53}. Foi relatado que após a triagem do câncer prostático ter sido iniciada em 1988, a incidência desse câncer aumentou substancialmente, atingindo o pico em 1992, segundo dados do *Utah Cancer Registry*⁵⁴. A taxa de incidência voltou ao nível básico de 1988 ou dela se aproximou nos anos seguintes. Não obstante, alguns médicos norte-americanos ainda hesitam em adotar o teste de PSA para triagens em massa, de vez que ainda não está comprovada a sua eficácia na redução da mortalidade e morbidade do câncer prostático^{55,56}. Por outro lado, a triagem em massa ou individual através da dosagem sérica do PSA não é recomendada pelo Comitê de Oncologia da Associação Francesa de Urologia⁵⁷. Quanto ao emprego da razão L/T do PSA em triagens, Bangma *et al.* fizeram o acompanhamento de uma população não selecionada de 1726 homens nos quais foram realizados o DRE, a TRUS e a medição do PSA total e a razão L/T do PSA⁵⁸. Os autores constataram que a razão L/T do PSA não melhorou significativamente a especificidade para detecção do câncer prostático, e que a combinação da dosagem de PSA total e o DRE continua sendo o padrão para essa finalidade. Reissigl *et al.* investigaram o uso da proporção L/T do PSA no soro para aumentar a capacidade de uma triagem baseada no PSA e/ou o programa para a detecção precoce do câncer prostático e também os *cut-off* apropriados para serem usados nesse ensaio⁵⁹. Esse estudo retrospectivo em 266 homens revelou que, para o PSA entre 2,5-10,0µg/l, usando-se o *cut-off* de 22% para a razão L/T do PSA, podia-se

obter uma sensibilidade de 98%, evitando-se simultaneamente 30% de biópsias desnecessárias. Medições do percentual de PSA livre no soro melhoram a especificidade na triagem do câncer prostático em homens selecionados com elevados níveis de PSA total no soro; todavia, os *cut-off* ideais da razão L/T e a faixa do PSA para sua aplicação, ainda devem ser estabelecidos posteriormente⁶⁰.

• O PSA após prostatectomia radical

O emprego da prostatectomia radical no tratamento do câncer prostático localizado aumentou com o advento da triagem pelo PSA^{61,62}. Um aumento nos níveis do PSA sérico após a prostatectomia radical é um indicador sensível da persistência da doença após a cirurgia, e precede as manifestações clínicas de progresso da doença^{63,64}. A progressão da doença é definida como a evidência clínica de recorrência local ou dis-tante e/ou da elevação isolada no nível do PSA em duas medições consecutivas⁶⁵. Um nível não detectado de PSA, menor que 0,5µg/l^{66,67} para alguns ensaios con-vençionais de PSA, ou menor do que 0,2µg/l para outros⁶⁵, é usado como um padrão ouro para declarar como livres do tumor os indivíduos submetidos a prostatectomia radical⁶⁸. Numa série de 1.623 homens com um acompanhamento de dez anos após prostatectomia anatômica retropúbica em casos de doença clinicamente localizada, a detecção do PSA foi a única evidência de recorrência em 18% dos pacientes. Pacientes com níveis pré-operatórios de 10,1-20,0µg/l apresentaram uma taxa significativamente mais baixa de recorrência do que pacientes com níveis pré-operatórios de PSA superiores a 20µg/l⁶⁸. Pruthi *et al.* investigaram o tempo de duplicação e a recorrência do PSA, em pacientes nos quais não tiveram êxito na prostatectomia radical⁶⁹. Em 80 pacientes o valor médio da duplicação foi de 284 dias e o tempo médio para a recorrência foi de 648 dias. Enquanto que o tempo de duplicação do PSA parece representar a agressividade do câncer prostático original, o tempo de recorrência reflete a extensão da doença residual pós-operatória⁶⁹.

Em geral, desde a introdução dos ensaios de PSA, os pacientes submetidos a prostatectomia radical têm revelado uma tendência a apresentar câncer prostático em estágio inferior, confinado ao órgão por ocasião da avaliação inicial e o tumor é mais freqüentemente não-diplóide⁷⁰. Contudo, os ensaios de PSA diferem na sua capacidade de detectar níveis baixos de PSA após a prostatectomia radical⁷¹. Os clínicos responsáveis por pacientes com câncer prostático têm necessidade de conhecer quais os valores de PSA no soro masculino que sinalizam a presença de células produtoras de PSA a fim de que pacientes com doença residual após prostatectomia radical possam ser identificados o mais cedo possível para início de uma terapia de socorro^{67,72}. Pesquisadores têm tentado melhorar os limites para a detecção do PSA em testes, justificando que a recorrência do câncer será detectada mais cedo se métodos mais sensíveis forem utilizados na monitorização dos pa-

cientes⁷³. Um teste de PSA ultra sensível é caracterizada pelo seu limite de detecção mais baixa (LDB), o qual, por definição, é a menor quantidade de analito capaz de ser detectada por um valor de confiança predeterminado, em geral de 95% ou 99%. Contudo, são muitos os fatores que contribuem para a variação no LDB, por isso não é surpreendente que diferentes pesquisadores relatem diferentes valores de LDB, inclusive para o mesmo teste comercial. Enquanto que o LDB ajuda a definir o limite analítico mais baixo na faixa capaz de ser relatada, ele não deve ser usado como fundamento para decisões clínicas⁷². Os pontos de *cut-off*, clinicamente úteis, são em geral 2,4 vezes mais elevados do que o LDB⁷³. Vessella *et al.* lançaram a expressão "limite de detecção biológico" tomando o LDB como valor base e adicionando-lhe a precisão inter-ensaios (2 desvios padrão (DP)) que é derivada pela determinação de concentrações de baixo nível do soro de PSA próximas ao LDB⁷⁴. Klee *et al.* usaram o conceito "sensibilidade funcional", que avalia a precisão dos ensaios de soro humano através da determinação da menor concentração numa série de *pools* de soro que atinge um coeficiente de variação (CV) interensaios de 20%⁷⁵. Stamey *et al.* introduziram ainda um outro termo, "limite de detecção de câncer residual" (LDCR), em que está implícito que o PSA medido nos soros de pacientes submetidos a tratamento de câncer prostático é o PSA efetivo, e não o "ruído" decorrente do ensaio^{76,77}. Neste caso, a concentração média do PSA de + 3 DP em soros coletados durante cinco anos ou mais de homens reconhecidamente curados através de prostatectomia radical constitui o verdadeiro controle do teste para os pacientes; qualquer valor acima do controle tem 99% de probabilidade de não corresponder a um paciente curado, *i.e.* existe um PSA verdadeiro nos soros dos pacientes. Empregando este método, os autores determinaram o LDCR para o *Tosoh AIA Tosoh Medics, Foster City, California*, EUA e o *Corning-Nichols (San Juan Capistrano, California, EUA)* ensaio de quimioluminescência de 0,07µg/l e 0,05µg/l, respectivamente⁷⁷. Yu *et al.* avaliaram o valor clínico após prostatectomia radical para um ensaio de PSA ultra sensível com um LDB de 0,001µg/l⁷⁸. Foi comprovado que os aumentos no PSA pós-operatório de 0,001 a 0,1µg/l após prostatectomia radical estão associados a características clinico-patológicas de um mau prognóstico. Os ensaios de PSA normalmente disponíveis apresentam LDB maior que 0,05µg/l, o que limita sua capacidade para identificar o câncer prostático recorrente e fornecer subsídios para um prognóstico nos primeiros anos após a cirurgia⁷⁹. O ensaio Immulite de PSA, com uma sensibilidade menor que 0,002µg/l e um limiar decisório clinicamente útil de 0,01µg/l, proporciona informação útil que em elevado grau prediz atividade cancerosa em pacientes dentro do prazo de 2 anos após prostatectomia radical⁷⁹. Embora a utilização de ensaios ultrasensíveis proporcione um avanço, não há comprovação de que este ganho seja necessariamente favorável ao paciente⁸⁰. Atualmente, a premissa adotada é de que os tumores recorrentes muito pequenos são mais sensíveis à quimioterapia ou radioterapia do que os tumores maiores.

Considerando que ainda não foram documentadas terapias efetivas para a recorrência do câncer prostático, não se pode ainda aproveitar todo o potencial oferecidos pelos testes ultrasensíveis de PSA⁷³. Assim, os atuais testes ultrasensíveis de PSA devem ser empregados com cautela. Recomenda-se ainda que as medições de PSA sejam monitoradas serialmente e comparadas com os valores anteriores de PSA do mesmo paciente, a fim de detectar o mais cedo possível a recorrência de câncer prostático após prostatectomia radical⁷³.

• Novas tecnologias

O PSA geralmente fornece poucas informações sobre a agressividade do câncer ou para prognóstico do paciente. Novos testes em desenvolvimento, capazes de detectar células de tumor prostático que tendo deixado a próstata circulam na corrente sanguínea do paciente ou estão implantadas em outros tecidos, podem auxiliar o médico a decidir se um tratamento mais agressivo se justifica e seria capaz de ajudar a determinar o estágio da doença. Um desses testes utiliza a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) para a detecção de quantidades mínimas de PSA RNAm⁸¹. Os pacientes com células produtoras de PSA no sangue antes da cirurgia, apresentam pior prognóstico, bem como elevado índice de recorrência, de acordo com alguns estudos⁸². Muitas modificações foram introduzidas no ensaio de RT-PCR para aumentar a sua especificidade e sensibilidade. Galvan *et al.* desenvolveram um ensaio quantitativo de RT-PCR para monitorar o PSA RNAm, no qual incorporaram digoxigenina-dUTP em seqüências amplificadas⁸³. Esse ensaio foi previsto ser útil na pesquisa da disseminação do câncer. Corey *et al.* pesquisaram a capacidade de melhorar a detecção de micrometástases de câncer de próstata pelo aumento da detecção de células produtoras de PSA em circulação⁸⁴. Entre as alterações que foram introduzidas estavam o uso de primers PCR mais longos, um ciclo de amplificação de dois estágios e um *PCR hot-start*. Essas alterações reduziram o limite de detecção para uma célula de câncer prostático (linha celular LNCaP) em 108 células monocelulares em amostras de sangue periférico e medula óssea. Um conjunto de controles internos e externos foram incorporados no protocolo para melhorar a confiabilidade do teste. O *PCR nested* é uma outra modalidade que contribuiu para aumentar a sensibilidade de detecção de células produtoras de PSA⁸⁵. Em comparação com a técnica usada por Corey *et al.*⁸⁴, Zhang *et al.* foram capazes de detectar uma célula LNCaP diluída em 106 células mononucleares⁸⁶ empregando o ensaio *Nested RT-PCR*. Contudo, com a maior sensibilidade analítica do RT-PCR do RNAm do PSA, reduziu-se a especificidade do ensaio na detecção de células prostáticas no sangue⁸⁵. Adicionalmente, a manipulação da próstata durante a biópsia orientada por ultrassonografia transretal ou a ressecção transuretral podem provocar um sinal RT-PCR PSA positivo, devido à liberação de células pros-

tática na circulação periférica. A ressecção transuretral causa maior disseminação do que a biópsia orientada por ultrassonografia transretal⁸⁷.

Durante a avaliação do significado clínico dos resultados RT-PCR, foi constatado que é fraca a sensibilidade do RT-PCR na detecção de adenocarcinomas confirmados por biópsia⁸⁸. Também não se constatou existir vantagem significativa na previsão pré-operacional do estágio patológico⁸⁹, de vez que não há qualquer relação entre os estágios T1-T2 e a presença de células PSA-positivas em circulação^{90, 91}. Isto foi confirmado pelos resultados de *PCR-RT Nested* que não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os resultados de PCR-PSA e parâmetros clínicos histopatológicos⁹². Por outro lado, Ennis *et al.* relataram que 25% do estágio inicial das células prostáticas circulantes foram detectadas pelo PCR-RT, que no futuro poderá ser utilizado como previsor da progressão patológica em doenças clinicamente confinadas ao órgão⁹³. Entretanto, o PCR pode ser usado para prever a sobrevivência em pacientes com carcinoma prostático metastático andrógeno-independente, o qual é superior a uma única determinação de PSA⁹⁴. Células de câncer prostático têm sido pesquisadas em tecidos diferentes do sangue, como os nódulos linfáticos e aspirados de medula óssea. Em nódulos linfáticos pélvicos, a produção de um marcador específico da próstata com doença localizada indica metástase⁹⁵ e isso pode desempenhar algum papel no tratamento de pacientes com câncer prostático⁹⁶. Quanto à medula óssea, foi relatado que a presença de células de câncer prostático em pacientes com doença óssea evidente indica micrometástase. Isto significa que o PCR poderia se desenvolver num importante instrumento para a avaliação do envolvimento da medula óssea. Numa tentativa de estabelecer uma correlação entre a concentração de PSA no soro e doenças ósseas metastáticas em pacientes com câncer prostático, Deguchi *et al.* assinaram que 87,5% (14 em 16) dos pacientes com PSA de 25µg/l ou mais apresentavam doenças ósseas metastáticas, contrastando com 10,5% (2 em 19) dos pacientes com PSA inferior a 25 µg/l⁹⁷. Wood *et al.* relataram que a presença de células prostáticas circulando na medula óssea de pacientes submetidos a prostatectomia radical prevê o tempo de sobrevivência livre da doença⁹⁸. No entanto, o PCR-RT apresenta limitações na detecção de células micrometastáticas na medula óssea. As limitações são: a transcrição ilegítima de células associadas a tumor ou a genes específicos de epitélio em células hematopoiéticas, e a expressão deficiente do gene marcador em células tumorais micrometastáticas⁹⁹.

O antígeno prostático específico de membrana (PSMA), uma glicoproteína transmembraniforme integral (100000 Da) altamente específica do epitélio prostático, foi recentemente avaliada como um novo marcador do câncer prostático. O PSMA mostrou melhor correlação com o estágio do tumor primário, e o PSMA elevado correlacionou-se com um mau prognóstico e especialmente com a doença metastática¹⁰⁰. Os pesquisadores usaram a técnica de Western Blot para anali-

sar o PSMA no soro. No entanto, outros anticorpos foram descritos e têm sido utilizados no desenvolvimento de um novo ensaio que auxiliará na avaliação clínica do PSMA. O PCR também está sendo usado para PSMA, onde detecta células tumorais no sangue periférico¹⁰¹ e poderia ser um marcador valioso na detecção da disseminação de tumores hematogênicos micrometastáticos¹⁰². Esta técnica poderia eventualmente auxiliar na avaliação da eficácia da terapia neoadjuvante em doenças sistêmicas¹⁰³. Estudos longitudinais para correlacionar células prostáticas em circulação com a incidência futura de câncer poderiam levar de sete a dez anos para terminar. Esses estudos poderiam beneficiar pacientes com doenças localizadas. Os pesquisadores estão tentando isolar essas células produtoras de PSA ou PSMA a fim de verificar se são realmente cancerosas⁸². Comprovou-se que a eficiência da PCR-RT na detecção de células prostáticas circulantes na base do RNAm do PSMA é maior do que a baseada na RNAm do PSA^{86, 95}. Por conseguinte, um ensaio RT PCR mais aperfeiçoado poderia mostrar um promissor marcador do PSMA-RNAm. Adicionalmente, a análise do novo marcador em nódulos linfáticos pélvicos de pacientes portadores de câncer prostático localizado de alto risco pode indicar a presença de células metastáticas de tumor. Ferrari *et al.* empregaram o *RT-PCR Nested* com esta finalidade e identificaram células tumorais em nódulos linfáticos de 27 entre 33 pacientes com câncer, enquanto o exame patológico pode identificar apenas quatro⁹⁵. Entre 29 desses 33 pacientes sem comprovação patológica do envolvimento de nódulos linfáticos, 23 destes foram positivos pelos RT-PCR. A produção de PSMA foi detectada com frequência maior do que o PSA. Essas células podem ser responsáveis pelo elevado índice de falha sistêmica vista nesses pacientes. Zhang *et al.* relataram que 100% de pacientes com metástase óssea resultaram positivos nos ensaios combinados PSA/PSMA (64% pelo PSA e 91% pelo PSMA), e 29% dos pacientes com doença localizada resultaram positivos com qualquer dos dois marcadores (13% pelo PSA e 23% pelo PSMA)⁸⁶. Ao mesmo tempo, pacientes de controle foram negativos com qualquer dos dois marcadores. Embora o ensaio combinado seja mais sensível, o ensaio PSMA parece ser mais sensível do que o PSA isoladamente. Adicionalmente, a positividade do PCR-RT para PSA ou PSMA, que aumenta com o adiantamento do estágio do câncer prostático, pode ter valor no estadiamento dos pacientes presumidamente terem doença localizada¹⁰⁴.

• Outro marcador do câncer prostático

Além do PSA (calicreína 3 glandular humana (hK3)), a calicreína 2 humana (hK2) está sendo pesquisada como novo marcador do câncer prostático. O gene para o hK2 é 80% homólogo aos genes do PSA e do RNAm, ambos encontrados no epitélio prostático¹⁰⁵. A similaridade também é verificada no nível estrutural¹⁰⁶, onde a maioria dos aminoácidos estão centralizados nas partes que envolvem o local ativo¹⁰⁷. A calicreína hK2 é

produzida como um pró-hormônio (phK2) e convertida em hormônio hK2 extracelularmente^{108,109}, podendo então ser secretada pela próstata. A caliceína hK2 também é produzida pela linha celular LNCaP do carcinoma prostático¹¹⁰, e pela linha celular do câncer mamário, T47-D¹¹¹. A caliceína hK2 e o PSA estão ambos sob controle androgênico¹¹². Foi identificada uma proteína nuclear comum que combina corrente dos elementos androgênio-reativos (AREs) na região promotora do PSA e hK2. Após a ligação, o complexo interage então com o androgênio receptor (AR) e pode participar na regulação dos dois acima mencionados genes androgênio-reativos¹¹³. Foi demonstrado que a caliceína hK2 tem atividade semelhante à tripsina e também pode formar complexos moleculares com muitos dos principais inibidores de proteinase no soro¹¹⁴. Deperthes *et al.* foram os primeiros a descrever o hK2 PCI regulado¹¹⁵. Recentemente, demonstrou-se o hK2 em plasma seminal humano liqüefeito em associação com o PCI, como um 75-kDa complexo. A caliceína hK2, em sua forma livre foi recuperada imediatamente após a complexão, e a sua combinação com o PCI completou-se em 10 minutos. A hK2 livre foi capaz de hidrolisar semenogelinas e fibronectina *in vitro*. Os sítios de clivagem ficavam na carboxila lateral dos resíduos arginila. As principais proteínas seminais vesiculares, semenogelinas, foram hidrolizadas de maneira semelhante (na mesma extensão e com concentração catalítica semelhante) tanto pelo hK2 como pelo PSA. Contudo, a fibronectina ³/₄ uma proteína tipo da superfície celular, extracelular, fibrosa e adesiva^{116,117} foi hidrolizada mais eficientemente pelo hK2 do que pelo PSA¹¹⁸. Adicionalmente, foi demonstrado que uma preparação purificada da hK2 possui atividade similar à plasmina devido à conversão da uroquinase de cadeia simples (ScuPA) em uma enzima ativa com eficiência equivalente a 1/50 da plasmina. O PSA, por outro lado, não demonstrou essa atividade¹¹⁹.

A caliceína hK2 tem sido encontrada na circulação sanguínea de pacientes em diferentes proporções relativas comparadas ao PSA, e potencialmente pode ser usada como um novo marcador adjuvante do câncer prostático¹²⁰. Foi demonstrado em um estudo que 4% de tumores hK3-negativos apresentavam hK2 detectável¹²¹. Empregando a PCR-RT, Kawakami *et al.* relataram diferenças características entre a hK2 e células de tumor expressoras de hK3 RNAm. A resposta dos paciente a uma terapia anti-androgênica e a produção de hK2 RNAm foram correlacionadas reciprocamente, contrastando com a de hK3 RNAm¹²². Diferentes estudos concluíram que os resultados combinantes de RT-PCR para PSA-RNAm e hK2m-RNA aumentarão a sensibilidade na detecção de células de câncer prostático no sangue periférico e medula óssea^{122,123}, uma vez que a detecção da hK2m-RNA será valiosa na triagem de pacientes portadores de células de câncer prostático mas que não produzem PSA.

• Funções biológicas

No fluido seminal, o PSA está envolvido direta-

te na liquefação do coágulo seminal que se forma na ejaculação através da clivagem de uma proteína vesicular seminal. O PSA tem atividade enzimática tipo quimotripsina e tipo tripsina¹²⁴. Durante algum tempo pensou-se que o PSA era produzido exclusivamente pelas células epiteliais que revestem o ácinos e os ductos da glândula prostática⁶. Contudo, posteriormente ele foi encontrado em tecido mamário normal, benigno e maligno, assim como em secreções mamárias como o leite, fluido menstrual pele, endométrio normal, e em tumores de pulmão, cólon, ovário, fígado, rins, glândulas supra-renais e glândulas salivares¹²⁵. Enquanto que a concentração de PSA no plasma seminal é de 1 milhão µg/l, nos fluidos mamários poderia chegar até 5.000 µg/l no fluido aspirado do mamilo e 300µg/l no leite de mulheres lactantes¹²⁶. Embora atualmente se desconheça o papel fisiológico do PSA na mama feminina, ele é associado a pacientes de idades mais jovens, estágio inicial da doença e a presença de receptor de progesterona, mas não de estrogênio¹²⁷. Tem sido detectado em 30-40% dos tumores de seio, com menor frequência em outros tumores^{125,128}. O PCR-RT de PSA em nódulos linfáticos de mulheres com câncer da mama poderia detectar micrometástase em pacientes nódulo negativos¹²⁹. Em tecidos mamários sem patologia, o PSA existe principalmente complexado a ACT. As lesões, malignas ou benignas, produzem o PSA principalmente na forma livre, contrastando com o câncer prostático produtor de PSA^{130,132}. Diversos estudos também têm implicado que a produção de PSA é regulada por receptores de hormônio esteróides (progesterona, androgênio, glucocorticóide, mineral-corticóide, mas não o estrogênio)^{133,135}.

No fluido amniótico, o aumento do PSA é acompanhado por um aumento semelhante no soro de mulheres grávidas (o soro do PSA é mais baixo por um fator de 20-40). O PSA aumenta com a idade da gestação entre 11-12 semanas, com o aumento máximo ocorrendo entre 13-14 semanas. Este aumento nada tem a ver com a idade da mãe, sexo do feto ou abstinência de relações sexuais pela mãe. Contudo, depois de 15 semanas de gestação os fetos com trissomia do 21 ou do 18, anencefalia ou desordens renais foram associados a baixo PSA no fluido amniótico¹³⁶.

O PSA também pode clivar a proteína-3 ligado ao fator de crescimento tipo insulina que libera o fator de crescimento I (IGF-I) tipo insulina, biologicamente ativo, e desta maneira pode ter um efeito mitogênico¹³⁷. Devido à sua homologia ao fator- μ de crescimento do nervo, à proteína de ligação do fator de crescimento epidermal, e ao fator- α de crescimento do nervo, o PSA pode estar envolvido na regulação do crescimento dos tecidos mamários e outros¹³⁸. Recentemente, foi observado um outro papel para o PSA, na proteólise da proteína relacionado ao homem da paratiróide (PTHrP)¹³⁹. Embora muito tecidos possam produzir PSA, as quantidades produzidas são muito inferiores às produzidas por células prostáticas. Além disso, ainda está para ser esclarecido o papel biológico do PSA em tecidos normais e tumores.

CONCLUSÃO

Entre os diversos conceitos introduzidos para melhorar a especificidade dos resultados do PSA, ficou demonstrado que a razão L/T-PSA apresenta um melhor índice na detecção do câncer prostático e na diminuição do número de biópsias desnecessárias. O papel das técnicas moleculares para o PSA e o PSMA-RNA_m no câncer prostático está sendo avaliado. Até agora, os resultados indicam que o PSA-RNA_m seria um marcador com sensibilidade menor que o PSMA RNA_m. A positividade do PCR-RT poderia ser utilizada no futuro para acompanhamento clínico do estadiamento de pacientes com doença localizada devido à detecção da disseminação microhematogênica de células cancerosas. Isso proporcionará mais informações sobre o seu prognóstico geral e sobrevivência. No entanto, o uso de métodos quantitativos em lugar dos métodos qualitativos atualmente em uso poderia melhorar o desempenho dessas técnicas. Estudos recentes pesquisando a calicreína hK2 elegem esta proteína como um novo marcador do câncer prostático. A esta altura, parece que a combinação das medições do PSA e do hK2 ou do PSA e PSMA aumenta a sensibilidade na detecção do câncer prostático. O impacto final da combinação dos testes de ensaios antigos com os novos no tratamento de pacientes com câncer prostático exige pesquisa ininterrupta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Armbruster DA.** Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 1993; 39:181-95.
2. **Yu H, Giall M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJA, Levesque MA, et al.** Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55:2104-10.
3. **Here M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T.** Some physicochemical characteristics of gamma-seminoprotein: an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jpn J Legal Med* 1971; 25:322-4.
4. **Sensabaugh GF.** Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci* 1978; 23:106-15.
5. **Béjanger A, van Halbuk H, Graves HCB, Grandbois K, Stamey TA, Huang L, et al.** Molecular mass and carbohydrate structure of prostate-specific antigen: studies for establishment of international PSA standard. *Prostate* 1995; 27:187-97.
6. **Lilja H.** A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985; 76:1899-903.
7. **Watt KWK, Lu PJ, Tirnkuki T, Chan WP, Loo R.** Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:3166-70.
8. **Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY.** Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates singlechain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer* 1997; 71:897-9.
9. **Nixon RG, Brawer MK.** Enhancing the specificity of prostate-specific antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. *Br J Urol* 1997; 79 Suppl 1:61-7.
10. **Petterson K, Piironen T, Seppä M, Liukkonen L, Christensson A, Matikainen MT, et al.** Free and complexed prostate-specific antigen (PSA): *in vitro* stability, epitope map, and development of immunofluorometric assays for specific and sensitive detection of free PSA and PSA- α 1-antichymotrypsin complex. *Clin Chem* 1995; 41:1480-8.
11. **Diamandis EP, Yu H.** Editorial: new biological functions of prostate-specific antigen? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1515-7.
12. **Lilja H.** Regulation of the enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reaction with extracellular protease inhibitors in prostate cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 Suppl 220:47-56.
13. **Mitrunen K, Pettersson K, Piironen T, Björk T, Lilia H, Lövgren T.** Dual-label one-step immunoassay for simultaneous measurement of free and total prostate-specific antigen concentrations and ratios in serum. *Clin Chem* 1995; 41:1115-20.
14. **Kirollos MM.** Statistical review and analysis of the relationship between serum prostate-specific antigen and age. *J Urol* 1997; 158:143-5.
15. **Boyce N.** New PSA guidelines for African-Americans. *Clin Lab News* 1996; 22(10):18.
16. **Simsek U, Kutlu S, Yavascaouglu I, Oktay B, Özyurt M.** Seasonal variation of prostatic acid phosphate and prostate-specific antigen in patients without prostatic malignancy. *Eur Urol* 1992; 21 Suppl 1:111-4.
17. **Smith DS, Catalona WJ.** Rate of change in serum prostate-specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J Urol* 1994; 152:1163-7.
18. **Nixon RG, Wener MH, Smith KM, Parson RE, Strobel SA, Brawer MK.** Biological variation of prostate-specific antigen levels in serum: an evaluation of day-to-day physiological fluctuations in a well-defined cohort of 24 patients. *J Urol* 1997; 157:2183-90.
19. **Matzkin H, Laufer M, Chen J, Hareuveni M, Braf Z.** Effect of elective prolonged urethral catheterization on serum prostate-specific antigen concentration. *Urology* 1996; 48:63-6.
20. **Ornstein DK, Rao GS, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW, Catalona WJ.** Effect of digital rectal examination and needle biopsy on serum total and percentage of free prostate-specific antigen levels. *J Urol* 1997; 157:195-8.
21. **Ornstein DK, Smith DS, Rao GS, Basler JW, Ratliff TL, Catalona WJ.** Biological variation of total, free and percent free serum prostate-specific antigen levels in screening volunteers. *J Urol* 1997; 157:2179-82.
22. **Zisman A, Soffer Y, Siegel YI, Paz A, Lindner A.** Post ejaculation serum prostate-specific antigen level. *Eur Urol* 1997; 32:54-7.
23. **Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ.** Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentration. *Urology* 1997; 50:239-43.
24. **Honda SAA, Goldstein AP, Morita T, Sugiyama C, Cody L, Rios CN, et al.** Prostate-specific antigen concentrations in serum in acute illnesses. *Clin Chem* 1996; 42:1785-8.
25. **Honda SAA, Goldstein AP, Morita T, Sugiyama C, Cody L, Rios CN, et al.** Prostate-specific antigen concentrations in serum in acute illnesses. *Clin Chem* 1996; 42:1785-8.
26. **Woodrum D, French C, Shamel B.** Stability of free prostate-specific antigen in serum samples under a variety of sample collection and sample storage conditions. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:33-9.
27. **Piironen T, Petterson K, Suonpää M, Stenman U-H, Oesterling JE, Lövgren T, et al.** *In vitro* stability of free prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific antigen (PSA) complexed to α 1-antichymotrypsin in blood samples. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:81-7.
28. **Prestigiacomo AF, Stamey TA.** Clinical usefulness of free and complexed PSA. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 Suppl 221:32-4.
29. **Wener MH, Daum PR, Brawer MK.** Variation in measurement of prostate-specific antigen: importance of method and lot variability. *Clin Chem* 1995; 41:1730-7.
30. **Blase AB, Sokoloff RL, Smith KIVI.** Five PSA methods compared by assaying samples with different PSA ratios. *Clin Chem* 1997; 43:843-5.
31. **Wu JT.** Assay for prostate-specific antigen (PSA): problems and possible solutions. *J Clin Lab Analysis* 1994; 8:51-62.
32. **Nakamura RM.** Current and future directions regarding quality assurance and standardization of prostate-specific antigen immunoassays. *Cancer* 1994; 74:1655-9.
33. **Stenman U-H, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O.** A complex between prostate-specific antigen and α 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991; 51:222-6.
34. **Leinonen J, Lövgren T, Vornanen T, Stenman U-H.** Double-label time-resolved immunofluorometric assay of prostate-specific antigen and of its complex with (α 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1993; 39:2098-103.
35. **Corey E, Wegner SK, Corey MJ, Vessella RL.** Prostate-specific antigen: characterization of epitopes by synthetic peptide mapping and inhibition studies. *Clin Chem* 1997; 43:575-84.
36. **Prestigiacomo AF, Chen Z, Stamey TA.** A universal calibrator for prostate-specific antigen (PSA). *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 Suppl 221 : 57-9.
37. **Stenman U-H, Leinonen J, Zhang W-M.** Standardization of PSA determinations. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 Suppl 221:45-51.
38. **Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey TA.** Purification and characterization of prostate-specific antigen (PSA) complexed to α 1-antichymotrypsin: potential reference material for international standardization of PSA immunoassays. *Clin Chem* 1995; 41:1273-82.
39. **Oesterling JE, Jacobsen SJ, Klee GG, Pettersson K, Piironen T, Abrahamsson Per-A, et al.** Free, complexed and total serum prostate-specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol* 1995; 154:1090-5.
40. **Chen Z, Chen H, Stamey TA.** Prostate-specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J Urol* 1997; 157:2166-70.
41. **Jung K, Stephan C, Lein M, Henke W, Schnorr D, Brux B, et al.** Analytical performance and clinical validity of two free prostate-specific antigen assays compared. *Clin Chem* 1996; 42:1026-33.

42. Cuny C, Pham L, Kramp W, Sharp T, Soriano TF. Evaluation of a two-site immunoradiometric assay for measuring noncomplexed (free) prostate-specific antigen. *Clin Chem* 1996; 42:1243-9.
43. Woodrum DL, French CM, Hill TM, Roman SJ, Slatore HL, Shaffer JL, et al. Analytical performance of the Tandem-R free PSA immunoassay measuring free prostate-specific antigen. *Clin Chem* 1997; 43:1203-8.
44. Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G. Comparison of prostate-specific antigen (PSA) measured by four combinations of free PSA and total PSA assays. *Clin Chem* 1997; 43:1588-94.
45. Prestigiacomo AF, Lilja H, Petterson K, Wolfert RL, Stamey TA. A comparison of the free fraction of serum prostate-specific antigen in men with benign and cancerous prostates: the best case scenario. *J Urol* 1996; 156:3500-4.
46. Bangma CH, Rietbergem KBW, Kranse R, Blijenberg BG, Pettersen K, Schröder FH. The free-to-total prostate-specific antigen in screening for prostate cancer in the general population. *J Urol* 1997; 157:2191-6.
47. Van Cangh PJ, Nayer PD, Vischer LD, Sauvage P, Tombal B, Lorge F, et al. Free to total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) in the diagnostic gray zone of 1.8 to 10 ng/ml total PSA. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:45-50.
48. Thiel RP, Oesterling JE, Wojno KJ, Partin AW, Chan DW, Carter HB, et al. Multicenter comparison of the diagnostic performance of free prostate-specific antigen. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:45-50.
49. Pearson JD, Luderer AA, Metter EJ, Partin AW, Chan DW, Fozard JL, et al. Longitudinal analysis of serial measurements of free and total PSA among men with and without prostatic cancer. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:4-9.
50. Morgan TO, Mcleod DG, Leifer ES, Murphy GP, Moul JW. Prospective use of free prostate-specific antigen to avoid repeat prostate biopsies in men with elevated total prostate-specific antigen. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:76-80.
51. Demura T, Shinohara N, Tanaka M, Enami N, Chiba H, Togashi M, et al. The proportion of free to total prostate-specific antigen. *Cancer* 1996; 77:1137-43.
52. Roehrborn CG, Gregory A, McConnell JD, Sagalowsky AI, Wians FH. Comparisons of three assays for total serum prostate-specific antigen and percentage of free prostate-specific antigen in predicting prostate histology. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:23-32.
53. Littrup PJ. Future benefits and cost effectiveness of prostate cancer screening. American Cancer Society. *Cancer* 1997; 80:1864-70.
54. Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP, James BC, Janerich DT, Dibble RL. The fall in incidence of prostate carcinoma. *Cancer* 1995; 77:1342-8.
55. Austin OJ, Valente S, Hasse LA, Kues JR. Determinants of prostate-specific antigen test use in prostate cancer screening by primary care physicians. *Arch Fam Med* 1997; 6:453-8.
56. Selley S, Donovan J, Faulkner A, Coast J, Gillatt D. Diagnosis, management and screening of early localised prostate cancer. *Health Technol Assess Winch Eng* 1997; 10: 1-96.
57. Villers A, Grosclaude P, Haillet O, Abbou CC, Richard F, Boccon Gibod L. Diagnosis of cancer of the prostate (1): advancements in knowledge and practice since the consensus conference of 1989. The Cancer of the Prostate sub-committee of the Committee of Oncology of the French Association of Urology. *Prog Urol* 1997; 7 (3):508-15.
58. Bangma CH, Kranse R, Blijenberg BG, Schröder FH. The value of screening tests in the detection of prostate cancer. Part 1: results of a retrospective evaluation of 1726 men. *Urology* 1995; 46:773-8.
59. Reissigl A, Klocker H, Pointner J, Fink K, Horninger W, Ennemoser O, et al. Usefulness of the ratio free/total prostate-specific antigen in addition to total PSA level in prostate cancer screening. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A:62-6.
60. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhous HG, Ratliff TL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *J Am Med Assoc* 1995; 274:1214-20.
61. Smitt MC, Heltzel M. The results of radical prostatectomy at a community hospital during the prostate-specific antigen era. *Cancer* 1996; 77:928-33.
62. Yu Lao GL, Friedman M, Yao SL. Use of radical prostatectomy among Medicare beneficiaries before and after the introduction of prostate-specific antigen testing. *J Uro* 1997; 157:2219-22.
63. Hachiya T, Endo M, Nogaki J, Ishicla H, Okada K. Significance of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. *Int J Urol* 1997; 4:461-6.
64. Nadler RB, Andriole GIL. Who is best benefited by radical prostatectomy?. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10:581-93.
65. du Fosse W, Billiet I, Mattelaer J. Radical prostatectomy and prognostic factors. *Acta Urol Belg* 1997; 65:53-62.
66. Critz FA, Levinson AK, Williams WH, Holladay DA. Prostate-specific antigen na-dir: the optimum level after irradiation for prostate cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:2893-900.
67. Coetzee LJ, Hars V, Paulson DF. Postoperative prostate-specific antigen as a prognostic indicator in patients with margin-positive prostate cancer, undergoing adjuvant radiotherapy after radical prostatectomy. *Urology* 1996; 47:232-5.
68. Pound CR, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropublic prostatectomy: patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am* 1997; 24:395-406.
69. Pruthi RS, Johnstone I, Tu IP, Stamey TA. Prostate-specific antigen doubling times in patients who have failed radical prostatectomy: correlation with histologic characteristics of the primary cancer. *Urology* 1997; 49:737-42.
70. Amling CL, Blute ML, Lerner SE, Bergstralh EJ, Bostwick DG, Zincke H. Influence of prostate-specific antigen testing on the spectrum of patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy at a large referral practice. *Mayo Clin Proc* 1998; 73:401-6.
71. Sanders H, Graham SD Jr. Comparison of four automated prostate-specific antigen assays for detection of recurrence after radical prostatectomy. *Urology* 1997; 49:894-7.
72. Stamey TA. Lower limits of detection, biological detection limits, functional sensitivity, or residual cancer detection limit? Sensitivity reports on prostate-specific antigen assays mislead clinicians. *Clin Chem* 1996; 42:849-52.
73. Diamandis EP, Yu H, Melegos DN. Ultrasensitive prostate specific antigen assays and their clinical application. *Clin Chem* 1996; 42:853-7.
74. Vessella RL, Noteboom J, Lange PH. Evaluation of the Abbott IMx automated immunoassay of prostate-specific antigen. *Clin Chem* 1992; 38:2044-54.
75. Klee GG, Dodge LA, Zincke H, Cesterling JE. Measurement of serum prostate-specific antigen using IMx prostate-specific antigen assay. *J Urol* 1994; 151:94-8.
76. Stamey TA, Graves HCB, Wehner N, Ferrari M, Freiha FS. Early detection of residual cancer after radical prostatectomy by an ultrasensitive assay for prostate-specific antigen. *J Urol* 1993; 149:787-92.
77. Prestigiacomo AF, Stamey TA. A comparison of 4 ultrasensitive prostate-specific antigen assays for early detection of residual cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1994 152:1515-9.
78. Yu H, Diamandis EF, Wong PY, Nam R, Trachtenberg J. Detection of prostate cancer relapse with prostate-specific antigen monitoring at levels of 0.001 to 0.1 mg/L. *Urol* 1997; 157:913-8.
79. Witherspoon LR, Lapeyrolerie T. Sensitive prostate-specific antigen measurements identify men with long disease-free intervals and differentiate aggressive from indolent cancer recurrences within 2 years after radical prostatectomy. *J Urol* 1997; 157:1322-8.
80. van Iersel MP, Thomas CM, Segers MF, Witjes WP, Debruyne FM, Oosterhof GO. The use of 'ultrasensitive' prostate-specific antigen assays in the detection of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Br J Urol* 1996 77:418-22.
81. Moreno JG, Croce CM, Fisher R, Monne M, Vihko P, Mulholland G, et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6110-2.
82. Boyce N. New technologies aid in prostate cancer prognosis. *Clin Lab News* 1996; 22 (10):1-18.
83. Galvan B, Christopoulos TK. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate-specific antigen mRNA. *Clin Biochem* 1997; 30:391-7.
84. Corey E, Arfman EW, Liu AY, Vessells RL. Improved reverse transcriptase-polymerase chain reaction protocol with exogenous internal competitive control for prostate-specific antigen mRNA in blood and bone marrow. *Clin Chem* 1997; 43:443-52.
85. Henke W, Jung M, Jung K, Lein M, Schlechte H, Berndt C, et al. Detection of PSA mRNA in blood by RT-PCR does not exclusively indicate prostatic tumor cells. *Clin Chem* 1996; 42:1499-50.
86. Zhang Y, Zippe CD, Van Lente F, Klein EA, Gupta MK. Combined nested reverse transcription-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in detecting circulating prostatic cells. *Clin Can Res* 1997; 3:1215-20.
87. Moreno JG, O'Hara SM, Long JP, Veltri RW, Ning X, Alexander AA, et al. Transrectal ultrasound-guided biopsy causes hematogenous dissemination of prostate cells as determined by RT-PCR. *Urology* 1997; 49:515-20.
88. Goldman HB, Israeli RS, Lu Y, Lerner JL, Hollabaugh RS, Steiner MS. Can prostate-specific antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction be used as a prospective test to diagnose prostate cancer? *World J Urol* 1997; 15:257-61.
89. Ignatoff JM, Oefelein MG, Watkin W, Chmiel JS, Kaul KL. Prostate-specific-antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in preoperative staging of prostate cancer. *J Urol* 1997; 158:1870-4; discussion 1874-5.
90. De Cremoux P, Ravery V, Podgorniak MP, Chevillard S, Toubianc M, Thiounn N, et al. Value of the preoperative detection of prostate-specific-antigen-positive circulating cells by nested RT-PCR in patients submitted to radical prostatectomy. *Eur Urol* 1997; 32:69-74.
91. Thiounn N, Saporta F, Flam TA, Pages F, Zerbib M, Vieillefond A, et al. Positive prostate-specific antigen circulating cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction does not imply the presence of prostatic micrometastases. *Urology* 1997; 50:245-50.
92. Sardi I, Piazzini M, Ponchietti R, Fatini C, Di-Loro F, Guazzelli R. The use of RT-"nested" PCR of prostate-specific antigen to detect hematogenous neoplastic cells in patients with prostate adenocarcinoma. *J Mot Med* 1997; 75:751-7.
93. Ennis RD, Katz AE, de Vries GM, Heitman DF, O'Toole KM, Rubin M, et al. Detection of circulating prostate carcinoma cells via an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in patients with early stage prostate carcinoma. Independent from other pretreatment characteristics. *Cancer* 1997; 79:2402-8.

94. Ghossein RA, Rosai J, Scher HI, Seiden M, Zhang ZF, Sun M, *et al.* Prognostic significance of detection of prostate-specific antigen transcripts in the peripheral blood of patients with metastatic androgen-independent prostatic carcinoma. *Urology* 1997; 50:100-5.
95. Ferrari AC, Stone NN, Eyer JN, Gao M, Mandeli J, Unger P, *et al.* Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1498-504.
96. Gomella LG, Rai GV, Moreno JG. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in the management of prostate cancer. *J Urol* 1997; 158:326-37.
97. Deguchi T, Yang M, Ehara H, Ito S, Nishino Y, Takahashi Y, *et al.* Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 1997; 75:634-8.
98. Wood DP Jr, Banerjee M. Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol* 1997; 15:3451-7.
99. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, *et al.* Limitations of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15:2701-8.
100. Murphy GP, Barren RJ, Erickson SJ, Bowes VA, Wolfert RL, Bartsch G, *et al.* Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. Free-Prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen. *Cancer* 1996; 78:809-18.
101. Noguchi M, Miyajima J, Itoh K, Noda S. Detection of circulating tumor cells in patients with prostate-specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *Int J Urol* 1997; 4:374-9.
102. Fair WR, Israeli RS, Heston WD. Prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1997; 32:140-8.
103. Su SL, Heston WD, Perroti M, Cookson MS, Stroumbakis N, Huyrk R, *et al.* Evaluating neoadjuvant therapy effectiveness on systemic disease: use of a prostatic-specific membrane reverse transcription polymerase chain reaction. *Urology* 1997; 49 Suppl 3A:95-101.
104. Olsson CA, de Vries GM, Buttyan R, Katz AE. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer. *Urol Clin North Am* 1997; 24:367-78.
105. Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CYF, *et al.* Human glandular kallikrein 2 (hk2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology* 1997; 49:857-62.
106. Ferola R, Piironen T, Pettersson K, L6vgren J, Vehniainen M, Lilja H, *et al.* Immunoreactivity of recombinant human glandular kallikrein using monoclonal antibodies raised against prostate-specific antigen. *Prostate* 1997; 31:84-90.
107. Villoutreix BO, Lilja H, Pettersson K, L6vgren T, Teleman O. Structural investigation of the $\alpha 1$ -antichymotrypsin: prostate-specific antigen complex by comparative model building. *Protein Sci* 1996; 5:836-51.
108. Kumar A, Goel AS, Hill TM, Mikolajczyk SD, Millar LS, Kuus RK, *et al.* Expression of human glandular kallikrein, hk2, in mammalian cells. *Cancer Res* 1996; 56:5397-402.
109. Herrala A, Kurkela R, Porvari K, Isomaki R, Henttu P, Vihko P. Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and an inactive protein. *Clin Chem* 1997; 43:279-84.
110. Grauer LS, Charlesworth MC, Saedi MS, Finlay JA, Liu RS, Kuus RK, *et al.* Identification of human glandular kallikrein hk2 from LNCaP cells. *J Androl* 1996; 17:353-9.
111. Hsieh ML, Charlesworth MC, Goodmanson M, Zhang S, Seay T, Klee GG, *et al.* Expression of human prostate-specific glandular kallikrein protein (hk2) in the breast cancer cell line T47-D. *Cancer Res* 1997; 57:2651-6.
112. Murtha R Tindall DJ, and Young CY. Androgen induction of human prostate-specific kallikrein, hklk2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry* 1993; 32:6459-64.
113. Sun Z, Pan J, Balk SP. Androgen receptor-associated protein complex binds up-stream of the responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3318-25.
114. Frenette G, Deperthes D, Tremblay FIR, LaZure C, Dube CY. Purification of enzymatically active kallikrein hk2 from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1334:109-15.
115. Deperthes D, Chapdelaine P, Tremblay RR, Brunet C, Berton J, Hebert J, *et al.* Isolation of prostatic kallikrein hk2, also known as hGK-1, in human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245:311-6.
116. Stryer, L. *Biochemistry*, 3rd ed, pp 277-8, W H Freeman, New York, 1988.
117. Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 1996; 12:1259-67.
118. Deperthes D, Frenette G, Brillard Bourclet M, Bourgeois L, Gauthier F, Tremblay FIR, *et al.* Potential involvement of kallikrein hk2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *J Androl* 1996; 17:659-65.
119. Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY. Prostatic kallikrein hk2, but not prostate-specific antigen (hk3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer* 1997; 71:897-9.
120. Charlesworth MC, Young CY, Klee GG, Saed MS, Mikolajczyk SD, Finlay JA, *et al.* Detection of a prostate-specific protein, human glandular kallikrein (hk2), in sera of patients with elevated prostate-specific antigen levels. *Urology* 1997; 49:487-93.
121. Tremblay FIR, Deperthes D, Tetu B, Dube JY. Immunohistochemical study suggesting a complementary role of kallikreins hk2 and hk3 (prostate-specific antigen) in the functional analysis of human prostate tumors. *Am J Pathol* 1997; 150:455-9.
122. Kawakami M, Okaneya T, Furihata K, Nishizawa O, Katsuyama T. Detection of prostate cancer cells circulating in peripheral blood by reverse transcription for PCR hKlk2. *Cancer Res* 1997; 57:4167-70.
123. Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior SW, Tindall DJ, Young CY, *et al.* Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hk2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. *Urology* 1997; 50:184-8.
124. Cesterling JE. Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145:907-23.
125. Diamandis EP. Prostate-specific antigen new applications in breast and other cancers. *Anti Cancer Res* 1996; 16 Suppl 6C:3983-4.
126. Diamandis ER Yu H. Nonprostatic Sources of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997; 24:278-82.
127. Yu H, Gai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJA, Levesque MA, *et al.* Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55:2104-10.
128. Zarghami N, Levseque M, D'Costa M, Angelopoulou K, Diamandis EP. Frequency of expression of prostate-specific antigen mRNA in lung tumors. *Am J Clin Path* 1997; 108:184-90.
129. Lehrer S, Terk M, Piccoli SIR, Song HK, Lavagnini P, Luderer AA. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate-specific antigen may be a prognostic indicator in breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 74:871-3.
130. Melegos DN, Diamandis EP. Diagnostic value of molecular forms of prostate-specific antigen for female breast cancer. *Clin Biochem* 1996; 29:193-200.
131. Diamandis EP, Yu H, Lopez-Otin C. Prostate-specific antigen -a new constituent of breast cyst fluid. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38:259-64.
132. Borchert GH, Melegos DN, Tomlinson G, Gai M, Roagna R, Ponzone R, *et al.* Molecular forms of prostate-specific antigen in the serum of women with benign and malignant breast diseases. *Br J Cancer* 1997; 76:1087-9.
133. Yu H, Diamandis EP, Zarghami N, Grass L. Induction of prostate-specific antigen production by steroids and tamoxifen in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32:291-300.
134. Zarghami N, Grass L, Diamandis ER. Steroid hormone regulation of prostate-specific antigen gene expression in breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 75:579-88.
135. Lai LC, Erbas H, Lennard TW, Peaston RT. Prostate-specific antigen in breast cyst fluid: possible role of prostate-specific antigen in hormone-dependent breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 66:743-6.
136. Melegos DN, Yu H, Allen LC, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in amniotic fluid of normal and abnormal pregnancies. *Clin Biochem* 1996; 29:555-62.
137. Cohen P, Peehl DM, Graves HCB, Rosenfeld RG. Biological effects of prostate-specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol* 1994; 142:407-15.
138. Watt KWK, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:3166-70.
139. Iwamura M, Heilman J, Cockett AT, Lilja H, Gershagen S. Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology* 1996; 48:317-25.

Endereço para correspondência

Dr. Rose Daher,

Department of Pathology and Laboratory Medicine,

American University of Beirut,

PO.Box: 11-0236, Beirute, Libano.

Tel.: +961-1-354529, Fax: +961-1-345325

E-mail: rd02@aub.edu.lb

Análise dos hemogramas de ratos submetidos à ação da peçonha de *Bothrops jararaca**

Hemograms analysis from rats submitted to *Bothrops jararaca* venom

Pires¹, M. G. S.; Moresco², R. N.; Manetti³, L. C.;
Spillari⁴, L. P.; Munhoz⁵, T. P. & Oliveira⁶, J. R.

RESUMO - As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. Os pacientes picados pela *Bothrops jararaca* normalmente apresentam sérios danos teciduais e hemorragias severas. A análise do hemograma, em especial neste caso, é importante para avaliar se estão ocorrendo alterações hematológicas nas vítimas desses acidentes. O objetivo deste estudo foi verificar se doses sub-letais da peçonha de *Bothrops jararaca* causam alterações nos hemogramas. As análises das células sangüíneas dos 45 ratos utilizados neste estudo foram realizadas no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da PUCRS. Os valores de eritrócitos, hemoglobina, neutrófilos totais, linfócitos e basófilos, comparados ao grupo controle, não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, foi encontrado uma diminuição significativa do hematócrito e um aumento significativo da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Além disso, todos os grupos apresentaram uma diminuição do volume corpuscular médio (VCM). Também foi observada uma leucocitose com aumento de neutrófilos bastonados e monócitos, além de uma diminuição do número de eosinófilos em alguns grupos. Esses dados sugerem que o veneno da jararaca possa ter desencadeado uma resposta inflamatória acompanhada de um quadro subclínico de hemólise intravascular, causando, por sua vez, alterações hematológicas importantes.

UNITERMOS - *Bothrops jararaca*, hemograma, inflamação.

SUMMARY - *Bothrops* snakes are responsible for most of the ophidic accidents occurred in Brazil. Patients bitten by *Bothrops jararaca* usually present tissue damages and severe hemorrhages. Hemograms analysis is important to evaluate the hematological disorders that happen in the victims of these accidents. The objective of this study was to verify if nonlethals doses of *Bothrops jararaca* venom cause alterations in the hemograms. Blood cells analysis of 45 rats used in this study were accomplished at the Laboratory of Clinical Hematology at PUCRS. Red blood cells, hemoglobin, total neutrophils, lymphocytes and basophils, compared to control group, didn't show significant differences. However, was found a significant decrease of the hematocrit and a significant increase of the mean cell hemoglobin concentration (MCHM). Besides, all groups showed a decrease of the mean cell volume (MCV). Increase of leukocytes was also observed with increase of bands and monocytes, besides a decrease of eosinophils, in some groups. These results suggest that *Bothrops jararaca* venom might unchain an inflammatory process followed by development of subclinical intravascular hemolysis, causing important hematologic alterations.

KEY WORDS - *Bothrops jararaca*, hemogram, inflammation.

INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* são consideradas extremamente perigosas, sendo responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. Segundo o Programa Nacional de Ofidismo do Ministério da Saúde, dos 70.600 acidentes causados por serpentes, no período de junho de 1986 a dezembro de

1989, 64,78% deles foram atribuídos a este gênero⁹. A espécie *Bothrops jararaca* pertence a este gênero e é conhecida popularmente por jararaca ou jararaca-domato. A peçonha botrópica apresenta três atividades fisiopatológicas básicas: proteolítica (ou necrosante), coagulante e hemorrágica (ou vasculotóxica), desencadeando coagulopatias e outras desordens hematológicas importantes¹⁴. A ação hemorrágica dessa peço-

Recebido em 08/11/99
Aprovado em 07/01/2000

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Faculdade de Biociências, PUCRS

¹Bióloga, Aluna do Curso de Pós-Graduação em Biociências, PUCRS; ²Aluno do Curso de Graduação em Farmácia-Análises Clínicas, PUCRS;

³Farmacêutico-Bioquímico, Faculdade de Farmácia, PUCRS; ⁴Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, PUCRS;

⁵Professora de Hematologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, PUCRS;

⁶Professor Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Faculdade de Biociências, PUCRS.

na é atribuída a componentes específicos denominados hemorraginas. Os pacientes picados pela jararaca normalmente apresentam um quadro hemorrágico acompanhado de um processo inflamatório local. É importante lembrar também que os acidentes ofídicos contribuem para o estabelecimento da insuficiência renal aguda (IRA)³. Admite-se que a formação de microtrombos pelas ações coagulantes e vasculotóxicas é capaz de provocar isquemia renal por obstrução da microcirculação^{1,2,3,5,11}. Devido à grande variedade de alterações provocadas por esta peçonha, este estudo tem o objetivo de verificar se doses sub-letais da peçonha de *Bothrops jararaca* são capazes de causar alterações nos hemogramas dos ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados ensaios toxicológicos agudos, via intraperitoneal, em ratos Wistar, machos, adultos, utilizando um "pool" de venenos de serpentes da espécie *Bothrops jararaca*, todas procedentes da região serrana do estado do Rio Grande do Sul. O veneno foi diluído em solução fisiológica antes de ser administrado aos animais. As doses testadas foram: 0,12 (Grupo 1, n=5), 0,18 (Grupo 2, n=5), 0,27 (Grupo 3, n=5), 0,40 (Grupo 4, n=5), 0,60 (Grupo 5, n=5) e 0,90 (Grupo 6, n=5) mg/kg. Além desses, foi efetuado um grupo controle (Grupo 0, n=15), que recebeu somente solução fisiológica. Após 12 horas da administração, os ratos foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado por punção retro-ocular, sendo colocado em tubos contendo anticoagulante EDTA. As contagens totais de eritrócitos e leucócitos, além da determinação do

VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) foram obtidas utilizando o contador de células Coulter CBC5, e a contagem diferencial de leucócitos bem como a análise da morfologia celular foi realizada através da configuração de lâminas de esfregaços sanguíneos corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa¹⁵ e posterior observação em microscópio óptico Olympus. Os resultados deste estudo foram analisados estatisticamente por Anova, utilizando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os valores encontrados de eritrócitos, hemoglobina, neutrófilos totais, linfócitos e basófilos não apresentaram diferenças significativas, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, foi encontrado uma diminuição significativa do hematócrito, nos grupos 1, 2 e 3 (Fig.1) e do volume corpuscular médio (VCM) em todos os grupos (Fig.2), além de um aumento significativo da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), nos grupos 1, 2, 3 e 5 (Fig. 3). Também foi observada uma leucocitose nos grupos 5 e 6 (Fig. 4) com o aumento dos valores percentuais de neutrófilos bastonados nos grupos 1, 2, 3, 5 e 6 (Fig. 5) e monócitos nos grupos 1, 2 e 4 (Fig. 6). Foi verificada uma diminuição significativa dos valores percentuais de eosinófilos nos grupos 3, 4 e 6 (Fig. 7).

DISCUSSÃO

A diminuição do hematócrito e conseqüente altera-

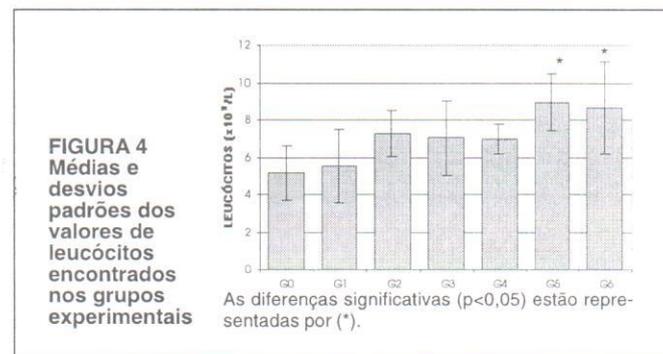
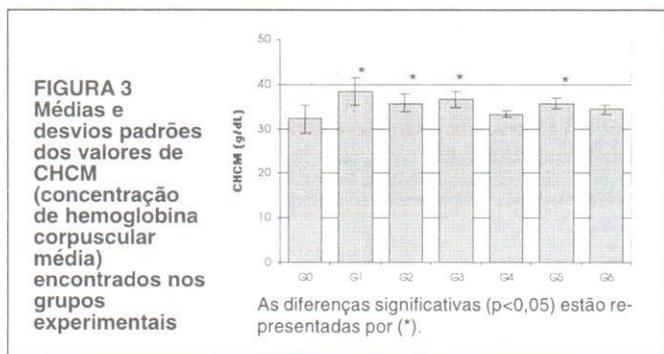
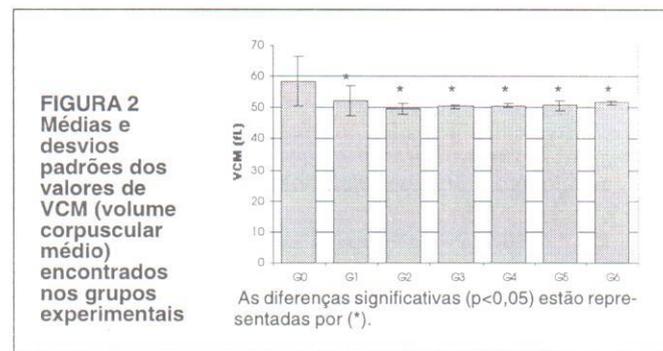
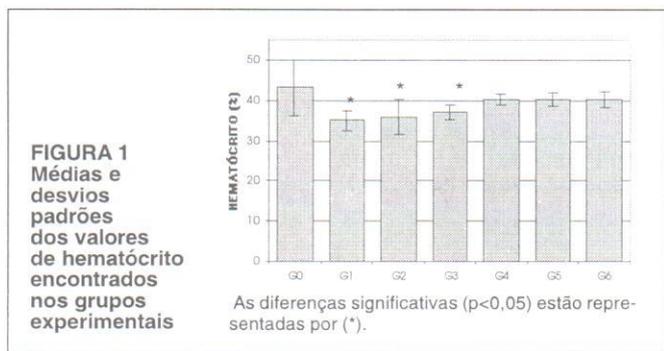


FIGURA 5
Médias e desvios padrões dos valores percentuais de neutrófilos bastonados encontrados nos grupos experimentais

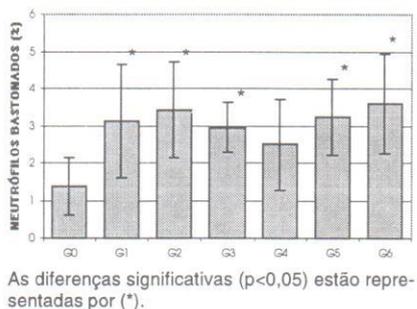


FIGURA 6
Médias e desvios padrões dos valores percentuais de monócitos encontrados nos grupos experimentais

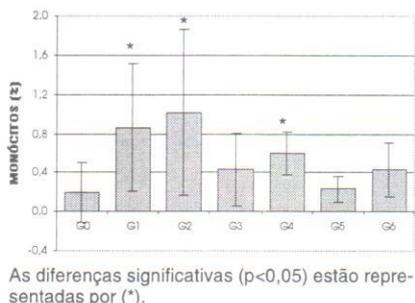
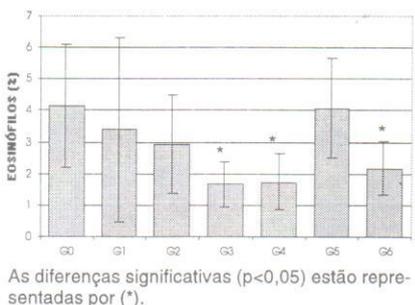


FIGURA 7
Médias e desvios padrões dos valores percentuais de eosinófilos encontrados nos grupos experimentais



ção de outros índices hematimétricos relacionados a ele sugere que a peçonha botrópica possa ter desenvolvido um quadro subclínico de hemólise intravascular, provavelmente decorrente da sua atividade hemolítica¹³. A diminuição do hematócrito, com o conseqüente aumento da CHCM pode ser encontrado em situações onde existe hemoglobina livre plasmática como, por exemplo, nos quadros de hemólise intravascular^{6,10}. Esta hemólise, por sua vez, quando ocorrida em determinadas situações, pode contribuir decisivamente para o desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada¹². Já o aumento do número de leucócitos, incluindo neutrófilos bastonados e monócitos, observado em alguns grupos, sugere que a peçonha possa ter desencadeado um processo inflamatório. A inflamação é apenas uma das formas como o organismo responde ao danos teciduais, agentes físicos ou organismos estranhos. As respostas inflamatórias e hemodinâmicas ocorrem simultaneamente, porque ambas têm a finali-

dade de controlar o dano provocado à região comprometida ou lesada⁷. Além disso, também é possível observar uma leucocitose nos quadros de crises hemolíticas com hemólise rápida⁸. A eosinopenia, conforme encontrada em nossos estudos, ocorre em estados inflamatórios agudos em conseqüência de uma rápida diminuição dos eosinófilos circulantes que, por sua vez, migram para os locais da inflamação⁸. Este achado também foi encontrado por Barraviera *et. al.* que, ao investigar os hemogramas de alguns pacientes picados por serpentes do mesmo gênero, após algumas horas, também encontraram uma diminuição significativa de eosinófilos⁴.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que as doses sub-letais da peçonha de *Bothrops jararaca*, administradas via intraperitoneal, em ratos, causaram alterações hematológicas importantes, caracterizando a instalação de um quadro hemolítico acompanhado de um processo inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral, C. F. S.; Da Silva, O. A.; Godoy, P. & Miranda, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snakebite. *Toxicon*, 23: 877-885, 1985.
2. Amaral, C. F. S.; Rezende, N. A.; Da Silva, O. A.; Ribeiro, M. M. F.; Magalhães, R. A.; Reis, R. J.; Carneiro, J. G. & Castro, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópicos e crotálicos: análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 28: 220-227, 1986.
3. Barraviera, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Ed. Publicações Científicas, 1994.
4. Barraviera, B.; Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Hanson, L. A. & Meira, D. A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops jararaca* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins.*, 1(1), 1995.
5. Da Silva, O. A.; Lopez, M. & Godoy, P. Bilateral cortical necrosis and calcification of the kidney following snake bite: a case report. *Clin. Nephrol.*, 11: 136-139, 1979.
6. Failace, R. *Hemograma: manual de interpretação*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
7. Harmening, D. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. 2ª ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1992.
8. Henry, J. B. *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 18ª ed. São Paulo: Manole, 1995.
9. Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde. Informações sobre o Programa Nacional de Ofidismo, 1990.
10. Ravel, R. *Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Achados Laboratoriais*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
11. Rezende, N. A.; Amaral, C. F. S.; Bambirra, E. A.; Lachatt, J. J. & Coimbra, T. M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 407-416.
12. Rodak, B. F. *Diagnostic hematology*. 1ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995.
13. Sano-Martins, I. S.; Santoro, M. L.; Morena, P.; Sousa e Silva, M. C. C.; Tomy, S. C.; Antônio, L. C.; Nishikawa, A. K.; Gonçalves, I. L. C.; Larsson, M. H. A.; Hagiwara, M. K. & Kamiguti, A. S. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28(3): 303-312, 1995.
14. Schwartsman, S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1992.
15. Spada, C.; Treitinger, A.; Ramos, L. F. M.; Moritz, E.; Ferreira, S. C.; Steinwandter, M. M.; Steinwandter, S. T.; Cezarotto, F. S.; Souza, N. M. A. & Silva, M. V. P. F. Avaliação da contagem diferencial de células sanguíneas por metodologia automatizada e microscopia. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 30(4):191,193,1998.

Endereço para correspondência
Professor Doutor Jarbas Rodrigues de Oliveira
Pontifícia Univ. Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Laboratório de Pesquisa em Biofísica
Av. Ipiranga, 6681 Pd 12A Caixa Postal 1429
90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil

PRÊMIO SBAC

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio SBAC" é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a US\$ 1,500 dólares americanos na data do Congresso, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio SBAC" tem por objetivo:

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Análises Clínicas no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas, com vistas à melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 45 dias antes do Congresso, 5 (cinco) cópias do trabalho original completo, atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, *summary* em inglês, palavras chaves (uniterms) e *key words* (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e serem originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será publicado com exclusividade na Revista Brasileira de Análises Clínicas e deverá ser obrigatoriamente apresentado pelo autor (ou autores) aos congressistas do CBAC em que foi premiado, em dia e hora determinados pela Comissão Julgadora do Prêmio e Comissão Organizadora do CBAC. Para isto, é necessário que o(s) autor(es) compareça(m) ao Congresso preparado(s) para fazer tal apresentação com slides, transparências e outros recursos que o(s) autor(es) julgar(em) pertinente(s);
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora ao "Prêmio SBAC", poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 a 4 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 5 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 3 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o "Prêmio SBAC", e aos outros 2 (dois), um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O "Prêmio SBAC" é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O trabalho inscrito mas não apresentado na sessão de Temas Livres do Congresso, será desclassificado para concorrer ao "Prêmio SBAC";
- 3) O trabalho concorrente ao Prêmio, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres obrigatoriamente por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 1996.

Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Presidente

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio SBAC

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro • RJ • 20270-340
e-mail: congresso@sbac.org.br

Utilização do sistema automatizado BacT/Alert® para o cultivo de fluidos biológicos não sanguíneos*

Use of BacT/Alert® System for culturing biological fluids other than blood

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva¹

RESUMO - O sistema BacT/Alert® (Organon-Teknika) é um sistema automatizado para a detecção de microrganismos presentes no sangue. Neste estudo, o referido sistema foi avaliado quanto à possibilidade de sua utilização para o cultivo de fluidos biológicos não sanguíneos, comparando-se com cultivos tradicionais. Ambos procedimentos mostraram resultados equivalentes quanto ao isolamento de microrganismos, porém o tempo de detecção foi sensivelmente menor no sistema BacT/Alert®, variando de 6 a 34 horas. Na metodologia tradicional, o tempo de detecção de positividade variou de 24 a 72 horas. Os resultados obtidos demonstram que o sistema automatizado BacT/Alert® pode também ser utilizado para a detecção de microrganismos em outros fluidos biológicos que não o sangue, com importante redução no tempo de detecção da positividade.

PALAVRAS-CHAVE - Sistema BacT/Alert®; fluidos biológicos; métodos automatizados.

SUMMARY - The BacT/Alert® System (Organon-Teknika) is an automated method for detection of microorganisms in blood. In this study, this system was evaluated for culturing biological fluids other than blood, compared with traditional culture method. Both procedures produced equivalent results for isolating microorganisms. However, the time for detection of positivity was different (6 to 34 hours with BacT/Alert® System and 24 to 72 hours with conventional method). The results confirm the importance of using BacT/Alert® System with biological fluids other than blood.

KEY WORDS - BacT/Alert® System; biological fluids; automated methods.

INTRODUÇÃO

O surgimento de novos patógenos cria dificuldades diagnósticas adicionais e maior demora na liberação dos resultados. A diminuição da mortalidade por infecções sanguíneas e em outros fluidos biológicos pode estar, atualmente, na dependência do desenvolvimento tecnológico associado ao diagnóstico precoce destas patologias. A rapidez e a precisão da metodologia utilizada são fundamentais para o ajuste da terapêutica empírica.

O sistema BacT/Alert® (Organon-Teknika) é um sistema automatizado inicialmente proposto para a detecção de microrganismos presentes no sangue. Neste estudo, o referido sistema foi avaliado quanto à possibilidade de sua utilização para o cultivo de fluidos biológicos não sanguíneos, comparando-se com cultivos tradicionais.

O objetivo principal foi determinar se o sistema BacT/Alert® permite maior detecção de microrganismos nos fluidos biológicos estudados em comparação com a metodologia tradicional.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no período compreendido entre julho/1998 e junho/1999 e avaliado pelo setor de microbiologia do Marcos Daniel Laboratório (Vitória/ES), utilizando o equipamento para hemoculturas BacT/Alert® 120 (Organon/Teknika), instalado na unidade localizada no Hospital Santa Mônica (Vila Velha/ES).

O aparelho tem seu princípio de teste baseado na detecção colorimétrica da produção de CO² pelos microrganismos. O equipamento é bastante ágil devido à sua alta sensibilidade. O gabinete de incubação (estu-

Recebido em 25/11/99

Aprovado em 30/11/99

*Trabalho realizado no setor de Microbiologia do Marcos Daniel Laboratório
Rua Fortunato Ramos, 123 - Santa Lúcia - Vitória/ES - 29055-290 - Tel.: xx.27.200.3737/
¹Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista - Marcos Daniel Laboratório - Vitória/ES

fa), com capacidade para monitorar até 120 frascos simultaneamente, agita continuamente as amostras, fazendo uma leitura com raio laser a cada 10 minutos e transmitindo-a ao computador que, através de um software, avalia as leituras e elabora gráficos de crescimento do germe, além de gerenciar dados do paciente e liberar estatísticas epidemiológicas.

Os frascos de cultura utilizados neste trabalho foram: anaeróbico adulto standard e aeróbico adulto contendo FAN® (Fator Neutralizador de Antibióticos). Os frascos possuem meios de cultura líquidos de composição definida, permitindo o ótimo desenvolvimento dos patógenos.

• Amostras clínicas estudadas

Líquor	92
Líquido Pleural	61
Líquido Ascítico	34
Líquido Peritonal	29
Líquido Pericárdico	18
TOTAL	234

• Coleta dos espécimes e inoculação nos frascos

Todos os testes foram realizados com base em solicitações médicas. A desinfecção das tampas dos frascos foi realizada com etanol 70%.

Todas as amostras foram inoculadas, em volumes iguais (dependendo da quantidade recebida para análise) nos dois tipos de frascos.

Todas as amostras foram também inoculadas em meios de cultura sólidos (ágar chocolate, ágar MacConkey), incubados a 37°C por 48 horas em microaerofilia e anaerobiose.

• Incubação dos frascos

Imediatamente após as coletas, todos os frascos aeróbicos foram aerados e incubados no aparelho; os frascos anaeróbicos obrigatoriamente não sofriam aeração. O protocolo adotado era a incubação a 35-37°C por até 7 dias. Nos casos de suspeita clínica de fungemia, os frascos eram preservados no aparelho por mais 14 dias.

Após a detecção de positividade de um ou mais frascos, os mesmos eram encaminhados para prosseguimento das análises. Foi considerada "cultura positiva" aquela onde houve crescimento de um ou mais microrganismos em um ou mais frascos.

• Processamento das amostras positivas

As tampas eram inicialmente desinfetadas com uma solução de álcool-acetona (50% v/v). Após secarem, era aspirada uma pequena quantidade de líquido (0,5 a 1,5 mL), por intermédio de se-

ringas de insulina. Estes volumes retirados dos frascos foram então utilizados para a preparação de esfregaços, os quais corados pelo método de Gram, nos indicaram em que meios deveríamos semear (não seletivos e/ou seletivos). Os meios para subcultivo de rotina dos frascos positivos foram: ágar sangue (ou chocolate) e ágar seletivo para bastonetes Gram-negativos (ágar EMB seg. Levine ou ágar MacConkey), incubados a 35-37°C em microaerofilia (placas de ágar sangue ou chocolate), aerobiose (placas de ágar seletivos para bastonetes Gram-negativos) e em anaerobiose (utilizando-se o sistema Anaerobac®-Probac), sendo que as incubações anaeróbicas só eram realizadas nas amostras que apresentavam crescimento somente nos frascos anaeróbicos.

Neste estudo, somente as amostras consideradas positivas pelo equipamento foram subcultivadas em meios sólidos. Não foram feitos repiques das amostras consideradas negativas pelo aparelho após o período de 7 dias de incubação.

Posteriormente, as identificações e os antibiogramas foram realizados no equipamento MicroScan Auto-SCAN 4® (Dade-Behring).

• Culturas falso-positivas

Foram consideradas falso-positivas aquelas onde houve a indicação de positividade do frasco pelo equipamento mas que na leitura do esfregaço corado pelo método de Gram e nos subcultivos não foram observados microrganismos.

TABELA 1
Positividade dos frascos utilizados

Tipo de frasco	Nº de frascos positivos
Aeróbico adulto com FAN	27
Anaeróbico adulto standard	29

TABELA 2
Comparação entre os tempos de detecção de positividade segundo as duas metodologias

Microrganismos isolados	Tempo médio (em horas) para a detecção de positividade	
	Sistema BacT/Alert®	Placas de ágar
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,7	24,0
<i>Staphylococcus coagulase (-)</i>	16,3	24,0
<i>Enterococcus</i> spp.	14,1	24,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20,4	48,0
Outros <i>Streptococcus</i>	18,6	24,0
Enterobactérias	6,5	24,0
Bastonetes Gram-negativos não fermentadores	9,8	48,0
Leveduras	16,8	24,0
Anaeróbios	34,2	72,0

RESULTADOS

Durante o período estudado, 468 frascos foram coletados e processados. Cada par foi considerado como representando uma única amostra clínica. Houve detecção de positividade em 12,4% das amostras analisadas tanto pelo sistema automatizado BacT/Alert® quanto pela metodologia clássica (manual).

Duas amostras (6,9%) foram positivas apenas nos frascos anaeróbicos.

• Culturas falso-positivas

Das 29 amostras consideradas positivas pelo equipamento, 4 (13,8%) foram consideradas falso-positivas, pois não houve observação de microrganismos tanto no esfregaço corado pelo método de Gram quanto nos subcultivos.

As quatro amostras falso-positivas foram detectadas nos frascos aeróbicos com FAN®.

• Comparação com os cultivos em meios sólidos

Em todas as amostras foram feitas culturas dos espécimes clínicos em meios sólidos, de acordo com a metodologia tradicional de inoculação e estriamento em placas de ágar.

Todos os microrganismos que se desenvolveram quando utilizados os frascos do sistema BacT/Alert® também foram isolados nos meios sólidos, havendo portanto, uma correlação de 100% entre o cultivo segundo a metodologia clássica (manual) e a metodologia automatizada proposta por este estudo.

As duas metodologias diferiram, no entanto, no tempo gasto para a detecção de positividade das amostras.

Não foram isolados fungos filamentosos nos fluidos biológicos analisados durante o período estudado.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o sistema automatizado BacT/Alert® pode também ser utilizado para a detecção de microrganismos em outros fluidos biológicos que não o sangue, com importante redução no tempo de detecção da positividade.

Outros estudos devem ser conduzidos com o intuito de testar um número maior de espécimes clínicos utilizando esta nova alternativa, na tentativa de padronização dos tipos de frascos a serem utilizados e dos tempos mínimos e médios para cada amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernard, D.G. Clinical comparison of the FAN and the standard BacT/Alert blood culture media. abstr. C83, p.505, 1994. In: *Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology*, Washington, DC.
2. Cawley, J. W. A comparison of BacT/Alert and Isolator blood culture systems, abstr. C57, p.455, 1993. In: *Abstracts of 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology*, Washington, DC.
3. Garner, J. S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* 16:128-140, 1988.
4. Lenette, E.H. et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology* 4th Ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985.
5. Sharp, S.E. et al. Clinical assessment of anaerobic isolates from blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17:19-22, 1993.
6. Silva, C.H.P.M. *Bacteriologia - um texto ilustrado*. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 1999.
7. Smith, J. A. et al. Comparison of Bactec 9240 and BacT/Alert blood cultures systems in an adult hospital. *J. Clin. Microbiol.* 33:1905-08, 1995.
8. Thorpe, T. C. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.* 28:1608-12, 1990.
9. Weinstein, T. C. et al. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia and fungemia. *J. Clin. Microbiol.* 33:978-81, 1995.
10. Zwadyk, P. C. et al. Comparison of Difco ESP and Organon Teknika BacT/Alert continuous monitoring blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 32:1273-79, 1994.

ERRATA

O artigo *Toxoplasmose - etiologia, avaliação laboratorial e profilaxia*, publicado na RBAC, vol. 31(2), 1999, na página 75, teve as legendas dos quadros A e B invertidas, sendo reproduzidas abaixo corretamente.

QUADRO A

Perfis sorológicos no curso da infecção toxoplásmica, segundo Camargo, M. E. - 1989

Perfil sorológico	Reações sorológicas				Infecção	
	Imunofluorescência		Fixação do complemento	Hemaglutinação indireta	Período de infecção	Duração
	Anti IgG	Anti IgM				
I	Maior que 1:4.096*	Positiva	Maior que 1:80	Menor que 1:1.024	Inicial (toxoplasmose aguda)	Poucas semanas
II	Maior que 1:4.096	Negativa	Maior que 1:80	Maior que 1:1.024	De transição	Semanas ou meses
III	Até 1:4.096	Negativa	Menor que 1:80 (freqüentemente negativa)	Até 1:1.024	De infecção pregressa (freqüentemente normais)	Permanente após infecção

(*) Eventualmente títulos inferiores ou mesmo negativos, nos primeiros dias de infecção.

QUADRO B

Perfis sorológicos no curso da infecção toxoplásmica, segundo Camargo, M. E., modificado por Ribeiro, C.A.V.

Perfil sorológico	Reações sorológicas			Infecção		
	Imunofluorescência		Aglutinação direta	Hemaglutinação indireta	Período	Duração
	IgG	IgM				
I	Variável	Positiva	Variável	Menor que 1:2.028	Inicial (toxoplasmose aguda)	Semanas até meses
II	Maior que 1:2.048	Negativa	Maior que 1:2.048	Varável	De transição	Meses ou anos
III	Até 1:2.048	Negativa	Até 1:2.048	Até 1:2.048	De infecção pregressa (freqüentemente normais)	Permanente após infecção

PRÊMIO PNCQ

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio PNCQ" é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio do Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a US\$ 1,500 dólares americanos na data do Congresso, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio PNCQ" tem por objetivo:

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Controle de Qualidade no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas, com vistas à melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 45 dias antes do Congresso, 5 (cinco) cópias do trabalho original completo, atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (uniterms) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e serem originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será publicado com exclusividade na Revista Brasileira de Análises Clínicas e deverá ser obrigatoriamente apresentado pelo autor (ou autores) aos congressistas do CBAC em que foi premiado, em dia e hora determinados pela Comissão Julgadora do Prêmio e Comissão Organizadora do CBAC. Para isto, é necessário que o(s) autor(es) compareça(m) ao Congresso preparado(s) para fazer tal apresentação com slides, transparências e outros recursos que o(s) autor(es) julgar(em) pertinente(s);
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora ao "Prêmio PNCQ", poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 a 4 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 5 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 3 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o "Prêmio PNCQ", e aos outros 2 (dois), um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O "Prêmio PNCQ" é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O trabalho inscrito mas não apresentado na sessão de Temas Livres do Congresso, será desclassificado para concorrer ao "Prêmio PNCQ";
- 3) O trabalho concorrente ao Prêmio, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres obrigatoriamente por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 1996.

Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Presidente

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio PNCQ

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro • RJ • 20270-340

e-mail: congresso@sbac.org.br

Excreção de oligossacarídeos em indivíduos com Doença de Gaucher tipo 1*

Oligosaccharide excretion in subjects with Gaucher Disease type 1

Dênis Reis de Assis¹, Ana Paula Costa Beheregaray², Ricardo Flores Pires³,
Cristiano Silveira da Silva⁴, Kristiane Michelin⁵, Roberto Giugliani⁷ & Janice Carneiro Coelho⁶

RESUMO - Foi avaliada a excreção urinária de oligossacarídeos em pacientes portadores da doença de Gaucher tipo 1 (DG1) comparando-a com aquela de indivíduos normais com o objetivo de se estabelecer um método de identificação para estes pacientes. Amostras de urina foram dessalinizadas por cromatografia de gel-filtração e aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) para a identificação dos oligossacarídeos através de suas bandas correspondentes. Foi observado que a excreção de oligossacarídeos na urina, representada por 5 bandas que foram visualizadas após borrifar a placa com uma solução composta por 0,25% de orcinol em ácido sulfúrico 20%, foram identificadas somente nos pacientes com DG1 mas não nos indivíduos normais. O método foi considerado suficientemente sensível para identificar os indivíduos com o distúrbio, além disso a CCD é uma técnica útil para a detecção da DG1, considerando ser um teste feito na urina e com custos relativamente baixos. O problema do método parece ser o tempo necessário para a preparação das amostras.

PALAVRAS-CHAVE - β -glicosidase, doença de Gaucher, glicocerebrosídeo, oligossacarídeos

SUMMARY - There was evaluated the urinary oligosaccharide excretion in patients with Gaucher disease Type 1 (GD1) comparing it with that from normal individuals, with the purpose to establish an identification method for these patients. Urine specimens were desalted by gel filtration chromatography and applied on silicagel thin layer chromatography (TLC) to identify the oligosaccharides through their correspondent bands. That was observed the urinary oligosaccharide excretion, standed for 5 bands that were visualised after spraying the layer with a 0,25% orcinol solution in 20% sulfuric acid, were identified only in the patients with GD1 but not in the normal individuals. Therefore the method was considered enough sensitive to identify these individuals, moreover the TLC is a useful technique for the GD1 detection, seeing that it is a urinary test and their costs are relatively low. The problem of the method seems be the necessary time in the sample preparation.

KEY WORDS - β -glicosidase, Gaucher disease, glucocerebrosidase, oligosaccharides

INTRODUÇÃO

Phillip Charles Gaucher descreveu em 1882 pela primeira vez a doença de Gaucher e suas células características em um paciente com esplenomegalia¹. Em 1905, Brill denominou-as de "doença de Gaucher" e "células de Gaucher", respectivamente². Trata-se de uma doença autossômica recessiva causada basicamente pela diminuição da atividade da enzima glicocerebrosidase (β -glicosidase ácida) resultando no acúmulo de seu substrato, um esfingolípido derivado da ceramida denominado de glicocerebrosídeo³, que se acu-

mula predominantemente no sistema monócito-macrofágico, originando a célula de Gaucher, cujo citoplasma tem aparência de papel de seda dobrado, resultante da deposição de glicolípídeos¹.

Atribui-se às células de Gaucher todas as manifestações não-neurológicas da doença⁴, que é uma desordem multissistêmica caracterizada por problemas hematológicos, organomegalia, doença esquelética e, ocasionalmente, por envolvimento pulmonar⁵. A doença de Gaucher tipo 1 (DG1) é a variante não-neuronopática⁶ e constitui mais de 99% dos casos⁴.

O sintoma mais comum da doença é a esplenome-

Recebido em 23/09/99

Aprovado em 18/10/99

* Trabalho realizado no Departamento de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Departamento de Bioquímica da UFRGS

¹Farmacêutico, bolsista do Serviço de Genética Médica do HCPA

²Bolsista de iniciação científica do CNPq/UFRGS

³Médico do Serviço de Genética Médica do HCPA

⁴Farmacêutico-bioquímico, bolsista do Departamento de Bioquímica da UFRGS

⁵Farmacêutica-bioquímica, bolsista do Serviço de Genética Médica do HCPA

⁶Professora do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, chefe do Departamento de Bioquímica

⁷Professor do Departamento de Genética, IB, UFRGS, chefe do Serviço de Genética Médica do HCPA

galia com ou sem hepatomegalia⁷ geralmente acompanhadas por anormalidades hematológicas como anemia e trombocitopenia, causando hemorragias⁶.

Em biópsia de medula óssea pode-se detectar a presença de células de Gaucher mas, devido à sua baixa especificidade, não deve ser o método de escolha para o diagnóstico da doença^{2,6,7}. O diagnóstico definitivo dá-se pela medida da atividade da enzima β -glicosidase ácida em fibroblastos da pele e/ou leucócitos do sangue periférico^{1,2,7} cujo valor é equivalente a cerca de 10% da atividade normal da enzima². Este método, embora eficaz, é relativamente caro sendo que sua aplicação é viável em indivíduos com suspeita clínica de apresentarem DG1. Além disso, muitas vezes o pesquisador não dispõe de amostras de sangue (ou não consegue isolar os leucócitos) e tem como única amostra disponível a urina, razão pela qual um método de avaliação mais apurado neste material é particularmente desejável.

Renkema *et al*⁸ relataram o aumento da quitotriosidase, uma enzima que contém ácido siálico ligado em sua cadeia, nos macrófagos de portadores da doença de Gaucher e De Jong *et al*⁹ descreveram um método cromatográfico com o qual tornou-se possível a identificação de um aumento da excreção de oligossacarídeos na urina destes pacientes.

No presente trabalho propomos que a avaliação da excreção urinária de oligossacarídeos por cromatografia em camada delgada de urina pré-tratada pode ser útil para a identificação de pacientes com DG1. Utilizamos para isto o método de De Jong *et al*⁹ adaptado, de maneira que estas amostras possam ser avaliadas preliminarmente pelo mesmo método cromatográfico usualmente utilizado para a triagem de esfingolipídeos em laboratórios de diagnóstico de erros inatos do metabolismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

A resina Bio-Gel P-2 foi adquirida da Bio-Rad Laboratories (C.A., USA). A placa de silicagel de nº 5553 provém da Merck (Darmstadt, Germany) bem como os demais reagentes.

Cinco indivíduos com DG1, confirmada pelo ensaio da β -glicosidase, acompanhados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que encontram-se, no momento, aguardando tratamento com reposição enzimática e dois indivíduos sadios participaram deste trabalho. Destes foi colhida uma amostra ocasional de urina.

• Preparação das amostras

Foi aplicado 1mL da urina em colunas de 17 mL montadas com resina Bio-Gel P-2 e constantemente lavadas com água bidestilada. Por este procedimento foram obtidas 14 frações de 1mL das amostras dessalificadas e livres de monossacarídeos a partir de cada amostra. As frações de número 4 a 9 foram reunidas⁹, os 6mL resultantes foram liofilizados por um aparelho

concentrador Savant Speed Vac Plus SC 210 A (New York, USA) e o pó resultante foi ressolubilizado em 1mL de água destilada.

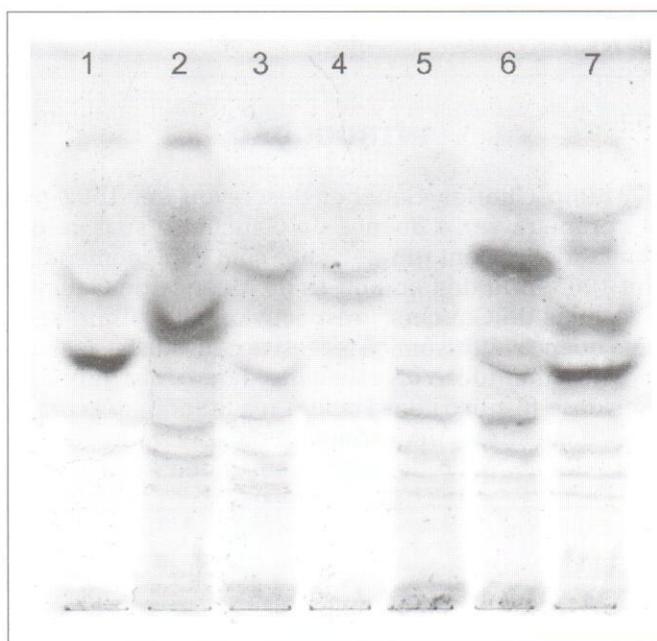
• Cromatografia em camada delgada

As quantidades de amostras que foram aplicadas, em μ L/cm, em placas de sílica-gel (10 x 10 cm) com suporte de alumínio foram equivalentes a 20.000/creatinina em mg/L da amostra original de urina. O solvente utilizado constituiu-se de n-butanol, ácido acético e água, na proporção de 2:1:1 (v/v/v), respectivamente. Após submeter a placa de silicagel com as amostras aplicadas a duas corridas no solvente, a mesma foi seca em ar quente e depois foi revelada borrifando-se uma solução reveladora para oligossacarídeos, composta por 0,25% de orcinol em ácido sulfúrico 20%. Após, a placa foi aquecida em estufa a 100 °C por 15 minutos para o aparecimento das bandas. Este procedimento baseou-se naquele proposto por Sewell em 1979¹⁰.

RESULTADOS

Foi detectado na urina de todos os portadores de DG1 testados, um aumento na excreção de oligossacarídeos, representados por bandas localizadas próximas do ponto de aplicação das amostras na placa, o que não ocorreu na urina dos controles normais testados (Figura I). Cinco bandas foram observadas abaixo da lactose, representada na coluna 1 pela banda inferior. Destes, pelo menos 3 não são visíveis na urina dos indivíduos normais.

FIGURA I
Cromatografia de oligossacarídeos na urina



1 - urina de indivíduo normal, a qual foi adicionado lactose;
2, 3, 5, 6 e 7 - urina de indivíduos com Doença de Gaucher tipo 1;
4 - urina de indivíduo normal

DISCUSSÃO

O método de cromatografia de oligossacarídeos empregado para este trabalho, foi aquele utilizado na rotina do Serviço de Genética Médica do HCPA na detecção de esfingolipidoses, com algumas alterações. Com o objetivo de não alterar a rotina do Serviço, resolvemos utilizar o mesmo método cromatográfico introduzindo somente a preparação, ou seja, a dessalificação e retirada dos monossacarídeos da urina. O método cromatográfico proposto por De Jong *et al*⁹ parece ser mais específico, pois detectou, segundo estes pesquisadores, 8 bandas abaixo da lactose na urina dos indivíduos com DG1 e destas, 4 não são identificadas na urina dos indivíduos saudáveis. Nosso método baseado em Sewell¹⁰ detectou somente 5 bandas, mas estas foram suficientes para identificar estes indivíduos e distingui-los dos normais.

Pelo fato destas bandas cromatográficas aumentadas localizarem-se próximas ao ponto de aplicação das amostras, as mesmas provavelmente representam oligossacarídeos de peso molecular mais alto. O aparecimento dessas moléculas na urina dos pacientes analisados pode estar relacionado ao aumento da concentração do glicocerebrosídeo nos macrófagos e monócitos destes pacientes, que pode estar ocasionando uma diminuição da disponibilidade do substrato das enzimas que catabolizam estas grandes moléculas de oligossacarídeos, que, não sendo convenientemente quebradas, passariam a ser excretadas inteiras na urina.

Apesar do número reduzido de pacientes testados, entendemos que um grande passo foi dado em busca de um teste mais simples e mais barato do que a dosagem da enzima glicocerebrosidase, e que, apesar de ser menos eficaz do que a mesma e de não fornecer o diagnóstico definitivo para a DG1, poderia ser utilizado como teste de triagem em urina. Assim, os pacientes cujos resultados da cromatografia em urina fossem alterados seriam encaminhados para a análise enzimá-

tica. Caso o método se mostre eficaz para uma amostra maior de pacientes, ainda nos resta o desafio de otimizar a técnica no sentido de torná-la mais rápida na etapa de preparação das amostras para que seja viável o seu uso como teste de rotina para a DG1.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à prof^a Magdolna M. V. Hampe e sua aluna Viviane M. Toniazio, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração na cromatografia de gel-filtração.

REFERÊNCIAS

1. Esplin JA. Overview: Gaucher Disease. *Mol-Med* 1994; 2: 1-5
2. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher Disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Pp. 2641-2670. New York: McGraw-Hill, 1995.
3. Athens JW. Desordens envolvendo o sistema de monócitos-macrófagos - "Doenças do Armazenamento". In: Wintrobe MM, Ed. *Hematologia Clínica*. Pp. 1787-1799. São Paulo: Editora Manole, 1998.
4. Beutler E. Review Article: Gaucher's Disease. *N. Engl. J. Med* 1991; 325: 1354-1360.
5. Pastores GM. Gaucher Disease Type 1: Clinical Assessment of Bone Disease. *Mol-Med* 1994; 2: 5-7.
6. Incerti C. Gaucher Disease: An Overview. *Seminars in Hematology* 1995; 32: 3-9.
7. Beutler E. Monocyte and macrophage disorders: lipid storage diseases. In: Williams WG, Ed. *Hematology*. Pp. 886-894. New York: McGraw-Hill, 1990.
8. Renkema GH *et al*. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur. J. Biochem*. 1997; 244: 279-285.
9. De Jong JGN *et al*. Oligossacarídeo excretion in adult Gaucher disease. *J. Inher. Metab. Dis*. 1998; 21: 49-59
10. Sewell A. An improved thin-layer chromatographic method for urinary oligossacarídeo screening. *Clin. Chim. Acta* 1979; 92: 411-444.

Endereço para correspondência

Dr. Janice C. Coelho

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 sala 2243

90035-003-Porto Alegre-RS - Brasil

Fone: 51.316-8011 • Fax: 51.316-8010 • E-mail: jcoelho@vortex.ufrgs.br

TEMA LIVRE

Procedimentos seletivos - como participar

Tema livre é uma das atividades do Programa Científico do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e ocorre sob a forma de painel apresentado durante o evento. Para participar é necessário enviar um resumo do seu tema livre, em formulário próprio, padronizado, para ser submetido à aprovação da Comissão de Tema Livre do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

A Comissão, nomeada pelo coordenador geral do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, é constituída por sócios da SBAC, possuidores do título de especialista em Análises Clínicas. Tem por finalidade apreciar os resumos, aprovar ou recusar, classificar dentro da especialidade, agendar a data e horário da apresentação e operacionalizar a apresentação do painel durante o congresso.

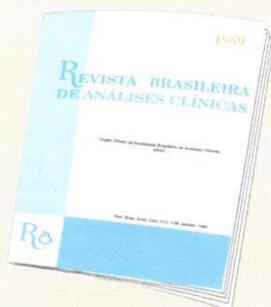
Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Rua Vicente Licínio, 95 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-340 - Tel.: (21)264-4449/234-4881
e-mail: congresso@sbac.org.br

A RBAC no novo milênio

Ao término deste século, comemorando seus 32 anos de existência, a Revista Brasileira de Análises Clínicas reproduz seu primeiro editorial, com os princípios que fundamentam sua linha editorial. O “emblema” da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas era apresentado, característica hoje indissociável em toda a divulgação feita pela entidade. O conteúdo resumido do editorial do vol. 1, nº 1, jan/abr, 1969, relembra os assuntos que marcaram essa edição da Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC.



EDITORIAL

A Revista Brasileira de Análises Clínicas, órgão oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), aparece num momento bastante oportuno, com o objetivo primordial de cumprir finalidades culturais e científicas. É, também, seu objetivo, unir todos os profissionais que militam no campo das análises clínicas. Com isto, se espera conseguir, um fortalecido pensamento dirigido para a consecução dos ideais comuns.

Nela, serão divulgados trabalhos originais, métodos de análises, notas prévias, resumos de trabalhos especializados, notícias de interesse geral, além de uma seção dedicada às consultas técnicas.

É sabido que atualmente aqueles profissionais estão sobremaneira atarefados e aturdidos, ante à vertiginosa avalanche de novas técnicas, oriundas de todas as partes do mundo. Daí, decorre a dificuldade que os analistas têm em se inteirar com o que de mais moderno surge nos diferentes setores das análises clínicas.

Mister se faz ressaltar a necessidade de intensiva cooperação de cada um, para vitalizar ainda mais a publicação deste periódico quadrimestral.

Ao apresentar saudações aos colegas, leitores e anunciantes, agradecemos antecipadamente a generosa acolhida e a valiosa colaboração que por certo serão dispensadas por todos.



O NOSSO “EMBLEMA”

O emblema utilizado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas é um logotipo, onde em uma só peça reúnem-se duas letras e um microscópio estilizado; entrevendo-se a letra A e C, o círculo do campo microscópico e o canhão do aparelho com a inclinação adequada.

Este logotipo foi elaborado gentilmente por Beta Empreendimentos e Promoções Ltda., instalada na rua Caiubi, 265, tel. 62-5417 — São Paulo.

• Reação imunológica com látex no diagnóstico da gravidez – microtécnica

Edgard Pinto Vallada/SBAC-SP & José A. de Nunes Mello/Fac. Med. de Sorocaba.

Os autores revelam a eficiência do uso do “Pregnosticon Planotest” num grupo de mulheres grávidas que demonstrou ter reação positiva e especificidade merecedora de confiança. Na execução da microtécnica ensaiada, o uso de alças calibradas além de reproduzir a positividade em todos os casos, proporcionou considerável economia de reagentes.

• Kit de fosfatase ácida / Inst. Mèrieux, França

É apresentada uma modificação do método King Armstrong com a utilização do kit nas dosagens das fosfatases, permitindo tecnicamente certas simplificações como a eliminação da desproteínização e centrifugação (ou filtração).

• Cultura da Urina / Edgard Pinto Vallada/SBAC-SP

O autor ressalta a necessidade de seguir as normas exigidas pelo método adotado, como meio seguro de comprovação das afecções do trato urinário.

• Como se obtém reagentes para laboratório clínico? / Lab. Merck

Divulgação comercial sobre modernas técnicas, novos reagentes, meios de cultura, corantes, etc.

• Suporte para a realização de microhematócrito em macrocentrifugadoras

Edgard Pinto Vallada/SBAC-SP

O autor apresenta uma técnica fácil para a determinação de microhematócrito em macrocentrifugadoras usando, como suporte para os tubos capilares, canudinhos de refresco, possibilitando a leitura de muitas provas simultaneamente.

• Laboratório de Análises Clínicas: atribuição profissional cumulativa

Portaria do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e Farmácia (DOU, 12.10.1962), regulamenta a responsabilidade técnica do farmacêutico em Laboratórios de Análises Clínicas.

• Divulgação do estatuto da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

Avaliação da dosagem de Proteína C-Reativa no soro e líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico diferencial das meningites bacterianas e meningites de etiologia presumivelmente viral*

Evaluation of C-Reactive Protein determination in the serum and cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of bacterial meningitis and presumed viral meningitis

Edna Maria Vissoci Reiche¹, Jaqueline Capobianco², Gisele Alcântara de Oliveira³, Helena Kaminami Morimoto¹, Tieme Matsuo⁴, Sueli Hiromi Tuboi³, Sílvia Tieko Yasunaga⁵, Elaine Regina Delicato⁵, Ana Paula Correa Pardal⁵ & Jovelina Almeida de Andrade⁶

RESUMO – Os autores avaliam a importância da Proteína C-Reativa (PCR) no diagnóstico diferencial da meningite bacteriana (MB) e meningite de etiologia presumivelmente viral (MEV) e comparam as dosagens de PCR no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR). Foram analisadas amostras de soro e LCR de 126 pacientes, 88 com diagnóstico de MB e 38 com diagnóstico de MEV, atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, entre os períodos de maio de 1994 a agosto de 1995 e janeiro a agosto de 1998. Demonstrou-se que 89,7% e 28,5% das amostras de soro de pacientes com MB e MEV, respectivamente, apresentaram valores elevados de PCR ($p=0,00001$). Em 100% das amostras de LCR de pacientes com MEV a dosagem de PCR foi não reagente ($p=0,00009$). A correlação da dosagem de PCR no soro e no LCR foi significativa ($p=0,000940$), confirmando a sua utilidade no diagnóstico diferencial da MB e MEV.

PALAVRAS-CHAVE – Proteína C-Reativa, meningite bacteriana, meningite viral, diagnóstico laboratorial

SUMMARY – The authors evaluate the importance of the C-Reactive Protein (CRP) in the differential diagnosis of bacterial meningitis (BM) and presumed viral meningitis (VM) and compare the CRP levels in the serum and in the cerebrospinal fluid (CSF). Serum and CSF samples from 128 patients, 88 with BM diagnosis and 38 with VM diagnosis seen at the North Regional University of Paraná, during the period from may 1994 to august 1995 and from january to august 1998. It was demonstrated that 89.7% and 28.5% of serum samples from patients with BM and VM, respectively, showed high levels of CRP ($p=0.00001$). In 100% of CSF samples from patients with VM, the CRP was negative ($p=0.00009$). The correlation of the determination of the CRP in the serum and CSF was significant (0.000940), confirming its usefulness in the differential diagnosis of BM and VM.

KEY WORDS – C-Reactive Protein, bacterial meningitis, viral meningitis, laboratory diagnosis

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório compreende várias reações bioquímicas, denominadas de Resposta de

Fase Aguda, quando são sintetizadas aproximadamente trinta proteínas plasmáticas que desempenham funções específicas e importantes na inflamação. Aparecem em elevadas concentrações a Proteína C Reativa (PCR), a

Recebido em 13/10/1999
Aprovado em 07/1/2000

*Trabalho realizado no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

¹Docente de Imunologia Clínica do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia

²Docente de Doenças Transmissíveis, Departamento de Clínica Médica

³Médica Residente de Doenças Transmissíveis do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP)

⁴Docente de Estatística, Departamento de Matemática Aplicada

⁵Acadêmicos de Farmácia da UEL

⁶Técnica de Laboratório do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná

haptoglobina, a ceruloplasmina, o fibrinogênio, a α -1-antitripsina, a substância amilóide A (SAA), a-1 glicoproteína ácida, α -1 quimiotripsina e α -2 macroglobulina¹⁴. A concentração das proteínas de fase aguda varia, refletindo diferenças na produção de cada proteína na resposta de fase aguda. A maioria aumenta duas ou mais vezes o valor normal. As mais sensíveis com relação à atividade momentânea da inflamação são a PCR e a SAA, devido aos seus baixos níveis de concentração basal, rápido aumento após estímulo inflamatório, podendo aumentar até 1000 vezes acima do valor normal e pequeno tempo de vida média¹⁵.

Tillet e Francis, em 1930, descobriram a PCR observando que o soro de pacientes com doença febril aguda formava complexos precipitantes com o polisacarídeo C da parede celular do *Streptococcus pneumoniae*⁷.

O estudo da seqüência de aminoácidos da PCR mostrou homologia com o domínio CH₃ das IgG, com a cadeia pesada dos antígenos HLA e com a proteína C₁t (subcomponente do C₁ do complemento). Assim, a PCR possui a capacidade de interagir com o receptor da fração Fc da imunoglobulina e ativar a Via Clássica do Complemento. Possui dois sítios de ligação, um sítio dependente de cálcio, com afinidade por radicais fosfatos, colina e poliânions; e outro sítio não dependente de cálcio que se liga aos policátions. A ampla ocorrência desses radicais na natureza, e em diversas paredes bacterianas, explica o fato da PCR ligar-se a uma grande variedade de substâncias e promover a opsonização⁷.

As sínteses das proteínas de fase aguda são induzidas por um largo número de citocinas que entram na circulação após serem produzidas pelos macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e alguns outros tipos de células⁹.

Entre as diversas funções atribuídas à PCR tem-se a capacidade de se ligar a componentes da membrana celular, principalmente à fosfocolina, assim como à cromatina e seus fragmentos, formando complexos que ativam a via clássica do sistema complemento, com liberação de opsoninas e eventual fagocitose e remoção dessas estruturas da circulação. Outras funções seriam a inibição do crescimento de células tumorais, modulação da função de polimorfonucleares e macrófagos, agregação e secreção plaquetárias e inibição da formação de linfócitos T-dependentes^{14,15}.

Geralmente os níveis de PCR no soro são inferiores a 0,2mg/l em indivíduos sadios⁷. São considerados normais níveis séricos entre 0,07 e 3mg/l, em média 0,8mg/l¹⁴. Valores da PCR no líquido cefalorraquidiano (LCR), em indivíduos sadios, variam de 0 a 0,108 mg/l. Já em indivíduos doentes, os valores de PCR no LCR estão na faixa de 0,11 a 0,325mg/l, com média de 0,176mg/dl¹¹. Os níveis séricos de PCR parecem aumentar progressivamente com a idade. Níveis de 0,05 a 57,6mg/l, com valor médio de 4,86mg/l, foram obtidos em amostras de soro de adultos sadios (doadores de sangue), enquanto que níveis de 0,02 a 14,4mg/l, com valor médio de 1,65mg/l, foram obtidos em soro de crianças, sugerindo que infecções subagudas e/ou in-

flamação sem a presença de sintomas clínicos poderiam ser responsáveis por níveis séricos mais elevados do que descritos na literatura¹².

Descrita inicialmente no decurso de infecções bacterianas, ela foi posteriormente colocada em evidência no soro de pacientes com uma grande variedade de doenças infecciosas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, infecções por fungos ou parasitas, fase aguda de artrite reumatóide, infarto do miocárdio e tumores malignos. A PCR pode estar aumentada no soro de pacientes com Síndrome de Guillain-Barré, esclerose múltipla, tuberculose ativa, hepatite infecciosa aguda, algumas infecções virais, doenças inflamatórias e necróticas, pacientes queimados e após trauma cirúrgico²⁰. Aumentos também são observados durante a gravidez, em 50-90% de mulheres que usam contraceptivos e em pessoas normais com idade maior que 60 anos^{1,6}.

Embora a detecção de níveis elevados de PCR no soro não seja específica para uma doença em particular, é um indicador útil de processo inflamatório. Aparece aumentada no soro a partir da sexta hora após o início do estímulo inflamatório, atingindo o máximo entre 18 e 48 horas, e decrescendo progressivamente com a resolução da agressão⁴. Este fato permite que a sua dosagem seja útil na detecção precoce de um processo inflamatório, entre eles o diagnóstico da meningite bacteriana (MB), representando um marcador adicional na triagem laboratorial da MB^{9,10}.

Em crianças menores que 6 anos de idade um nível sérico discriminatório para PCR de 20mg/l pode ser utilizado para diferenciar entre meningite de etiologia bacteriana de viral, mas para pacientes mais velhos um nível sérico discriminatório de 50mg/l é mais apropriado³.

Os métodos laboratoriais mais comumente usados são o de precipitação em tubo capilar, aglutinação em látex, imunodifusão radial, radioimunoensaio, imunonefelometria e imunoturbidimetria²⁰.

Os objetivos do presente estudo foram verificar a importância da PCR no diagnóstico diferencial da MB e da MEV e comparar a dosagem de PCR no soro e no LCR das amostras analisadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foi feito um estudo prospectivo de amostras de soro e LCR de 126 pacientes, com idade variando de 10 dias a 66 anos (média de 10,1 \pm 10,8 anos), 82% menores do que 15 anos, sendo 88 com MB confirmada por cultura ou suspeita de MB pelas alterações liquóricas e 38 com suspeita de MEV pelas alterações liquóricas, atendidos no Pronto Socorro e Enfermarias do Setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, no período de maio de 1994 a agosto de 1995 e no período de janeiro a agosto de 1998. Foram colhidas de cada paciente, quando possível, três amostras de soro e LCR; a primeira amostra foi obtida no momento da admissão do paciente, a segunda foi colhida no quarto

dia de internação e a terceira entre o décimo e o décimo quarto dia de internação, ao final do tratamento.

A dosagem de PCR no soro e no LCR desse pacientes foi realizada através do método de aglutinação em látex com determinações qualitativas e quantitativas (*In vitro*[®]). A reação de aglutinação em látex foi considerada reagente quando houve presença de aglutinação, indicando que a concentração de PCR estava igual ou acima de 6,0 mg/l em amostras não diluídas, assim essas amostras foram tituladas pelo método quantitativo. Na ausência de aglutinação considerou-se reação não reagente, ou seja, a concentração de PCR estava inferior a 6,0 mg/l. Para a realização do teste quantitativo, as amostras foram diluídas conforme recomendação do fabricante. A leitura foi a maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação e o resultado foi expresso em mg/l. Controles positivos e negativos foram utilizados em todos os ensaios qualitativos e quantitativos. Utilizou-se soro como amostra porque no caso de ser usado plasma, o fibrinogênio pode causar agregação inespecífica das partículas de látex.

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra os resultados da dosagem de

TABELA 1
Comparação da dosagem de Proteína C-Reativa (PCR) no soro de pacientes com Meningite Bacteriana (MB) e Meningite de Etiologia Viral (MEV)

	Não reagente (< 6mg/l)	Reagente (≥6mg/l)	Total
MB	8(10,25%)	70(89,70%)	78
MEV	20(71,40%)	8(28,50%)	28
Total	28	78	106

sensibilidade: 89,0%; especificidade: 71,0%; p= 0,00001.

TABELA 3
Correlação da dosagem de Proteína C-Reativa no soro e no líquido cefalorraquidiano obtida na primeira amostra colhida dos pacientes analisados

SORO \ LCR	Não reagente (< 6mg/l)	Reagente (≥6mg/l)	Total
Não reagente (< 6mg/l)	9(100%)	0	9
Reagente (≥6mg/l)	10(40%)	15(60%)	25
Total	19	15	34

p= 0,000940.

PCR no soro de 106 amostras analisadas. Nas 28 amostras de pacientes com suspeita de MEV disponíveis para análise, 20 (71,40%) apresentaram resultado não reagente e 8 (28,5%) resultado reagente para PCR no soro. Amostras de soro de 78 pacientes com MB foram analisadas, das quais 70 (89,00%) foram reagente e 8 (10,25%) não reagente para PCR. Foi obtido um p= 0,00001 que foi estatisticamente significativo. A sensibilidade e a especificidade foram de 89,0% e 71,0%, respectivamente.

Considerando a menor sensibilidade do método utilizado (6mg/l), os títulos séricos iniciais de PCR nos pacientes com MB variaram de não reagente a 1/256, equivalente a níveis menores que 6mg/l a 1536mg/l, enquanto que nas amostras de soro de pacientes com MEV os valores variaram de não reagente a 1/4, equivalente a níveis menores que 6mg/l a 24mg/l, tendo somente uma amostra de soro apresentado título de 1/64, equivalente a 384mg/l, em um paciente com caxumba (Figura I).

Quanto às dosagens de PCR no LCR dos pacientes com MB, os títulos variaram de não reagente a 1/4, equivalente a menor que 6 mg/l a 24 mg/l e nos pacientes com MEV todas as amostras demonstraram resultado não reagente, equivalente a níveis menores que 6 mg/l (Figura II).

TABELA 2
Comparação da dosagem de Proteína C-Reativa (PCR) no líquido cefalorraquidiano de pacientes com Meningite Bacteriana (MB) e Meningite de Etiologia Viral (MEV)

	Não reagente (< 6mg/l)	Reagente (≥6mg/l)	Total
MB	43(53,75%)	37(43,25%)	80
MEV	24(100%)	0(0%)	24
Total	67	37	104

sensibilidade: 46,20%; especificidade: 100,0%; p= 0,0000931.

TABELA 4
Correlação da dosagem de Proteína C-Reativa no soro e no líquido cefalorraquidiano obtida na terceira amostra colhida dos pacientes analisados

SORO \ LCR	Não reagente (< 6mg/l)	Reagente (≥6mg/l)	Total
Não reagente (< 6mg/l)	7(100%)	0	7
Reagente (≥6mg/l)	39(92,8%)	3(7,2%)	42
Total	46	3	49

p= 0,232756.

gistraram que a PCR não se eleva nas meningites asépticas, enquanto que está elevada em todos os casos de meningite bacteriana^{5,19}. Uma avaliação de 37 crianças de 0-12 meses com meningite purulenta e/ou septicemia, demonstrou que a PCR estava aumentada em 32 crianças¹³.

Os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 e Figuras I e II coincidem com os dados registrados na literatura. Embora 28,50% das amostras de soro de pacientes com MEV também apresentassem resultado reagente para a dosagem de PCR, os títulos séricos detectados foram consideravelmente inferiores ao obtidos nas amostras de soro de pacientes com MB.

A literatura registra que o método quantitativo rápido para PCR foi considerado útil no diagnóstico de meningites bacterianas, fornecendo valores séricos sempre maiores que 20 mg/l^{10,11}. Neste estudo, em somente um caso de meningite viral pelo vírus da caxumba associado à parotidite, portanto com envolvimento tecidual extenso, foi encontrado um valor acima de 20mg/l no primeiro dia e menor que 20mg/l no dia seguinte, revelando ser um importante indicador para diagnóstico, acompanhamento e prognóstico das meningites.

A quantificação de PCR no LCR foi demonstrada ser útil no diagnóstico diferencial das meningites, quando os valores médios de PCR no LCR foram 3,5 vezes maiores nos portadores de meningites bacterianas que naqueles com meningites assépticas, e os valores se mantiveram elevados após a negatização das culturas¹⁸. Mesmo após o início da antibioticoterapia, a PCR se manteve em níveis elevados, com valores de 55 a 375mg/dl¹¹.

Através das dosagens seriadas de PCR (Figuras I e II), verificou-se que após o estabelecimento de uma adequada antibioticoterapia nas infecções bacterianas, os títulos de PCR começaram a ter um declínio nas suas concentrações no soro e no LCR, propiciando uma ferramenta útil no monitoramento da eficácia do tratamento e detecção de complicações na fase de recuperação das meningites bacterianas.

As dosagens de PCR no soro e no LCR obtidas na primeira amostra analisada apresentaram correlação estatisticamente significativa (Tabela 3) e confirmou-se que o nível sérico de PCR é um bom indicador diferencial de MB e MEV, podendo orientar precocemente o clínico quanto à sua conduta. As dosagens de PCR no soro e no LCR obtidas na terceira amostra analisada não apresentaram correlação estatisticamente significativa (Tabela 4). A não correlação poderia ser explicada pela normalização dos níveis de PCR ter ocorrido mais precocemente no LCR do que no soro, uma vez que no LCR se apresentavam em níveis mais baixos. No entanto, é importante salientar que há uma grande variação individual na quantidade absoluta de PCR produzida em resposta a um estímulo específico (seja ele inflamatório, infeccioso ou traumático), de modo que uma única determinação de PCR não deveria ser inter-

pretada isoladamente. Portanto, os níveis séricos da PCR deveriam ser analisados dentro do contexto clínico e preferencialmente de forma seriada, a fim de informar com maior precisão e precocidade o grau de atividade inflamatória, orientando a conduta terapêutica¹⁴. Porém, um valor de PCR maior que 20mg/l sugere fortemente infecção bacteriana, autorizando a introdução de antibioticoterapia, até que outros dados clínicos e laboratoriais confirmem a etiologia da meningite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Antunes L J, Matos K T F.** *Imunologia Médica*. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, p. 76-77, 1992.
2. **Corral CJ, People JM, Maxon ER, Hughes WT.** C-Reactive Protein in spinal fluid of children with meningitis. *The Journal of Pediatrics*, 99, 365-369, 1981.
3. **Hansson LO, Axelsson G, Linné T, Aurelius E, Lindquist L.** Serum C-Reactive Protein in the differential diagnosis of acute meningitis. *Scand J Infect Dis* 25:625-630, 1993.
4. **Israel Filho G, Zunino JN.** Proteínas de fase aguda. *Ars Cvrandi*, 27(5): 109-110, 1984.
5. **Jansson E, Jalava L, Wager O.** C-Reactive Protein in bacterial meningitis. *Ann Med Exper Fenn*, 37, 4, 1959
6. **Kamoun P, Frejaville JP.** *Manual de laboratório: 500 exames*. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1989, p 507.
7. **Laville M, Revillard JP.** A Proteína C Reativa. *Laes*, n 4, p 18-24, Apr. 1983.
8. **McCarthy PL, Frank AI, Ablow RC, Master SJ, Dolan TF.** Value of the C-Reactive Protein test in the differentiation of bacterial and viral pneumonia. *J. Pediatr*, 92: 454-456, 1987.
9. **Mercatelli C, Laudari H, Picciarelli FJ.** Proteínas de fase aguda: marcadores da inflamação. *Newslab*, 3(13): 80-84, 1995.
10. **Peltola HO.** C-Reactive Protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system. *Lancet*: 980-983, may 1, 1982.
11. **Peltola H, Valmari P.** Serum C-Reactive Protein as Detector of Pretreated Childhood Bacterial Meningitidis. *Neurology*, 95, 251-253, 1985.
12. **Ribeiro MA.** Levels of C-Reactive Protein in serum samples from healthy children and adults in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:1055-1059, 1997.
13. **Sabel KG, Hansson LO.** The clinical usefulness of C-Reactive Protein (CRP) determinations in bacterial meningitis and septicemia in infancy. *Acta Paediatr Scand* 63:381-388, 1974.
14. **Serra CRB.** Contribuição das proteínas de fase aguda na monitorização das doenças reumáticas. *Rev. Bras Reumatol.* 37(3): 152-158, 1997.
15. **Steel DM, Whitehead AS.** The Major acute phase reactants: C-Reactive Protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today* 15(2): 81-87, 1994.
16. **Tanner AR, Collins AL, Bull FG.** The clinical value of rapid C-Reactive Protein measurement in cerebro-spinal fluid. *Clin Chim Acta*, 147, 267-272, 1985
17. **Valmari P, Peltola H, Ruuskanen O.** C-Reactive Protein as a predictor of sequelae in meningitidis. *Lancet*. 1, 741-742, 1984.
18. **Virji AM, Diven WF, Kelly RH.** CSF macroglobulin and C-Reactive Protein as aids to rapid diagnosis acute bacterial meningitis. *Clin Chim Acta*, 148: 31-37, 1985.
19. **Wager O, Janson E.** C-Reactive Protein in bacterial meningitidis. *Ann Med Exper Fenn*, 35, 352-356, 1957.
20. **Wicher K.** C-Reactive Protein. In: *Manual of Clinical Immunology*. 2.ed. American Society for Microbiology. Washington DC, p: 605-611, 1980.

Endereço para correspondência

Edna Maria Vissoci Reiche
Rua Piaui, 717/201, Londrina, Paraná – 86.020-320
Fax 43.337-5100
E-mail reiche@sercomtel.com.br

PRÊMIO HOTSOFT INFORMÁTICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Hotsoft Informática" é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio da Hotsoft Informática Ltda;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 1.000,00 (mil reais) na data do Congresso, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue durante os Congressos Brasileiros de Análises Clínicas.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio Hotsoft Informática" tem por objetivo:

- 1) Estimular o desenvolvimento de soluções que atendam às necessidades dos Laboratórios de Análises Clínicas em qualquer de suas especialidades na área de informática; e
- 2) Premiar o melhor Programa (*Software*) apresentado na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros Análises Clínicas.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os Programas (*Softwares*) inscritos e apresentados na sessão de Temas Livre dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao "Prêmio Hotsoft Informática", os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 45 dias antes do Congresso, 5 (cinco) disquetes do Programa original completo, com o seu respectivo manual de utilização;
- 3) Os Programas concorrentes deverão ser originais no país e no estrangeiro, não publicados ou comprometidos para divulgação em qualquer Revista Científica da Especialidade, e nem tão pouco já comercializado;
- 4) O Programa premiado será divulgado com exclusividade na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais Programas selecionados pela Comissão Julgadora ao "Prêmio Hotsoft Informática", poderão ser divulgados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 a 4 desqualifica o programa e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 5 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será escolhida antecipadamente e publicada no programa oficial do Congresso;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 3 (três) melhores Programas apresentados, outorgando a um deles o "Prêmio Hotsoft Informática", e aos outros 2 (dois), um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A Comissão Julgadora anunciará a sua decisão final após avaliar todos os Programas apresentados;
- 5) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio é indivisível e será conferido a apenas um programa, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Programa enviado para concorrer ao "Prêmio Hotsoft Informática" que não for apresentado na sessão de Temas Livres do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, será desclassificado;
- 3) O Programa concorrente ao prêmio, deve ser apresentado na sessão de Temas Livre obrigatoriamente por um dos autores do Programa regularmente inscrito no Congresso;
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 1996.

Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Presidente

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio HOTSOFT INFORMÁTICA

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro • RJ • 20270-340

e-mail: congresso@sbac.org.br

Pesquisa de eosinófilos em secreção nasal no Hospital Universitário de Florianópolis

A research on eosinophils in nasal secretion at the Florianópolis University Hospital

Steinwandter¹, S.T., Tencon², P. & Haas³, P.

RESUMO - A caracterização de uma rinite depende de vários exames que incluem desde a anamnese até outros exames complementares, para a definição da etiologia da rinite. É definido como rinite, um hiperfuncionamento nasal e inflamação tecidual, que leva à congestão nasal, rinorréia, obstrução nasal, prurido e espirros. As rinites podem ser classificadas quanto ao tipo como: não-alérgica e não-infecciosa, alérgica, alérgica aguda, alérgica sazonal, alérgica perene, infecciosa. Nesta pesquisa, analisamos 97 casos de exames, quanto à sua parte citológica, onde encontramos apenas 7 casos de eosinofilia. Na maior parte (46 exames), verificamos ausência de eosinófilos, seguido de 37 exames com menos de 10% de presença de eosinófilos. Quanto ao sexo, outro item observado, observamos a equivalência de casos, ou seja, 50 exames para o sexo masculino e 47 para o sexo feminino.

PALAVRAS-CHAVE - Eosinofilia em secreção nasal, pesquisa de eosinófilos.

ABSTRACT - The characterization of a rhinitis depends on various exams which go from anamnesis to other complementary exams to obtain a definition on rhinitis etiology. A nasal hyperfunctioning and tissue inflammation fit the definition of rhinitis, causing nasal congestion, rhinorrhea, nasal obstruction, itch and sneezing. As to type, rhinitis can be classified as: non-allergic and non-infectious, allergic, acute allergic, seasonal allergic, perennial allergic, and infectious. Along the present research, we analyzed 97 cases of exams, as to the cytology, having found eosinophilia in no more than 7 cases. In its majority (46 exams) we found eosinophils to be absent, to be followed by 37 exams showing less than 10% of eosinophils present. As to another observed item, gender, case equivalence was found, that is, 50 exams for men and 47 for women.

KEY WORDS - Eosinophilis in nasal secretion, research on eosinophils.

INTRODUÇÃO

Anatomia e fisiologia do nariz

Além de atuar como um órgão olfativo, o nariz aquece, mistura e filtra o ar inspirado, desempenhando um papel importante na defesa contra agentes ofensores do ar ambiente.

É revestido de epitélio pseudo-estratificado que repousa sobre a membrana basal, separando-o das camadas submucosas mais profundas. A submucosa contém glândulas mucosas, seromucosas e serosas. O fluxo sanguíneo regional é efetuado através de pequenas artérias, arteríolas e anastomoses arteriovenosas. Os vasos de capacitância, que consistem em veias e sinusóides cavernosos, são responsáveis pela desobstrução nasal.

Os sinusóides cavernosos situam-se abaixo dos capilares e das vênulas, exibem maior densidade nos ossos turbinados inferiores e médios e contêm células musculares lisas controladas pelo sistema nervoso simpático. A remoção do tono simpático ou, em menor grau, a estimulação colinérgica fazem com que este tecido erétil sinusóide se torne ingurgitado. A estimulação colinérgica produz dilatação arterial e promove a difusão passiva de proteínas plasmáticas nas glândulas, bem como secreção ativa das glândulas mucosas nas células¹.

Definição

A rinite é um hiperfuncionamento nasal e inflamação tecidual, que leva à congestão nasal, rinorréia, obstrução nasal, prurido e espirros⁵. Com frequência está

Recebido em 30/07/99

Aprovado em 11/10/99

¹Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário

²Acadêmica do curso de Farmácia Bioquímica da UFSC

³Professora da Disciplina de Citologia Clínica da UFSC

Departamento de Análises Clínicas / Centro de Ciências da Saúde / Univ. Fed. de Santa Catarina/ CP 476/ Campus Universitário/ Trindade/ Florianópolis -SC. - Fone: (048) 331-9712.

associada a gotejamento pós nasal, tosse, irritabilidade e fadiga, todos os quais ocorrem em uma relação temporal com a exposição ao alérgeno⁴. A rinite de maior ocorrência é a alérgica e é necessário sua diferenciação devido a diferença na terapêutica. Pode-se definir a rinite alérgica como o acometimento inflamatório da mucosa nasal desencadeado por reação de hipersensibilidade à alérgenos³.

• **Epidemiologia**

Embora a rinite geralmente não apresente risco de vida, freqüentemente leva a uma perturbação geral e redução da qualidade de vida, fazendo com que muitos pacientes procurem cuidados médicos⁵. A rinite alérgica é comum, sendo responsável por pelo menos 2,5% de todas as consultas médicas, por 2 milhões de faltas escolares por ano, 6 milhões de dias perdidos de trabalho, 28 milhões de redução da jornada de trabalho por ano. Estima-se em um bilhão de dólares o gasto anual com medicamentos prescritos e adquiridos sem receita para o tratamento da alergia¹.

• **Classificação**

As síndromes de rinite podem ser divididas em alérgicas, infecciosas, não-alérgicas e não-infecciosas. A rinite alérgica é subdividida em alérgica aguda, alérgica sazonal e alérgica perene.

• **Rinite Alérgica**

É em geral, provocada por antígenos inaláveis, embora alimentos e medicamentos possam também ser fatores etiológicos específicos².

• **Rinite Alérgica Aguda**

Desencadeada por exposição episódica de alérgenos inalados como proteínas salivares, pêlos de cavalo, pólen ou fezes de ácaro e poeira doméstica

• **Rinite Sazonal**

Acomete o indivíduo quando há exposição ao alérgeno em certas estações do ano como, por exemplo, pólen de árvores e gramíneas na primavera (febre das rosas) ou exposição ao pólen da ambrósia americana no outono (febre do feno), com sintomas previsíveis e reprodutíveis.

• **Rinite Alérgica Perene**

Desencadeada por exposição crônica a alérgenos comuns em regiões subtropicais com estações longas de polinização e presença contínua de alérgenos de fungos e ácaros de poeira e exposição a alérgenos ocupacionais.

• **Rinite Infecciosa**

Pode ser aguda ou crônica. Os sintomas crônicos

podem ser devidos a infecções específicas, como fungos ou tuberculoses. Infecções crônicas podem também ser resultado de deficiência na defesa inicial; isso pode ser sistêmico ou um problema local⁸.

• **Rinite não-alérgica e não-infecciosa**

Formam um grupo relativamente numeroso de patologias com etiopatologias diversas, que produzem sintomatologia às vezes semelhante, embora de intensidade menor, à da rinite alérgica³.

• **Mecanismo da alergia**

A expressão das doenças alérgicas reflete um padrão de herança auto-sômica dominante, com penetração incompleta. Este padrão manifesta-se na forma de propensão a responder à exposição a alérgenos inalatórios através da produção de altos níveis de IgE alérgeno-específica¹.

Quando acontece uma exposição à um alérgeno, proteínas antigênicas são dissolvidas em muco e entram na mucosa nasal⁹. Após ser inalado, esse alérgeno é internalizado por células imunocompetentes (linfócitos T e B), com subsequente produção de anticorpo específico - IgE. Após a síntese e a secreção de anticorpos IgE específicos para determinado alérgeno, esses anticorpos ligam-se a mastócitos e basófilos¹.

Quando acontece um novo encontro, dito desencadeante, entre o antígeno que determinou a formação desta IgE, específico para ele, e este anticorpo já fixado na superfície de um mastócito, há uma série de eventos elétricos, enzimáticos e químicos que determinam pela liberação da histamina, substância de reação lenta na anafilaxia e outros mediadores⁷.

A histamina provoca vasodilatação, resultando em congestão nasal, secreção de muco e aumento da permeabilidade vascular que, por sua vez, resulta em edema tecidual e espirros através da estimulação de fibras nervosas sensoriais¹.

Uma vez iniciada a reação alérgica, os mastócitos a amplificam ao liberarem não apenas agentes vasoativos, como também citocinas. Essas citocinas promovem ainda mais a produção de IgE, o crescimento dos mastócitos e o crescimento, a quimiotaxia e a sobrevivência dos eosinófilos¹. Os eosinófilos liberam radicais de oxigênio e proteínas, incluindo a proteína básica maior eosinofílica, que são tóxicos para o epitélio nasal. Esses eosinófilos parecem ser os responsáveis pela inflamação existente.

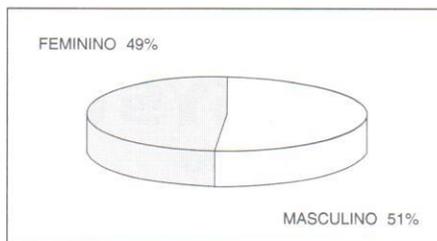
As alterações teciduais resultantes produzem os sintomas da doença e intensificam as respostas desenvolvidas com a exposição subsequente aos alérgenos e irritantes⁶.

• **Diagnóstico**

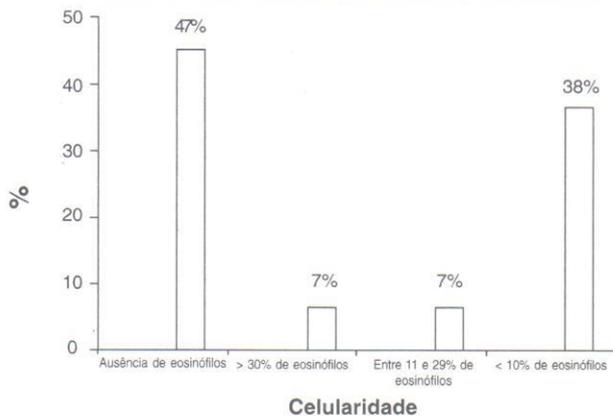
A classificação acurada e terapia subsequente requerem uma história, exames físicos cuidadosos e exames laboratoriais apropriados⁵. A primeira etapa é identificar os alérgenos que provocam sintomas¹. Os alérgenos procurados mais comuns são pólenes das gramíneas, árvores e ervas, fungos, alérgenos dos animais e ácaros da poeira⁶.

FIGURA I

Percentual quanto ao sexo de pacientes que realizaram o citograma nasal no Hospital Universitário de Florianópolis no período de março de 1998 a julho de 1999

**FIGURA II**

Percentual de eosinófilos nos exames analisados



A anamnese é uma parte importante do diagnóstico. São importantes nessa fase a identificação da época do início dos sintomas e a existência de fatores desencadeados do quadro, a frequência e intensidade das crises. A característica da secreção nasal (aquosa, clara, amarelada) orienta sobre a fase da crise e existência de infecção concomitante³.

O exame físico é sempre recomendado numa avaliação geral relativamente simples, buscando, basicamente, a existência de lesões cutâneas alérgicas concomitantes, como eczemas, dermatites e exantema, além da asma brônquica³.

Uma vez estabelecida pela anamnese e exame clínico, a provável natureza alérgica da rinite, a confirmação se faz por testes complementares, como o cutâneo, tipo imediato e recentemente muito mais preciso, por intermédio do teste rádio-alergo-absorvente ou simplesmente RAST e a citologia nasal.

A citologia nasal consiste na investigação da presença ou ausência de eosinófilos ou neutrófilos. A coleta de material ao nível do corneto inferior com swab parece ser o melhor meio de obtenção de produtos para esse estudo³. A presença de eosinófilo pode ser encontrada, geralmente em menor número e transitoriamente, na fase evolutiva dos resfriados comuns. O uso prolongado de vasoconstritores nasais parece trazer também um aumento de eosinófilos na secreção. Nas secreções infectadas há também um grande aumento do número de bactérias. A interpretação dos resultados no exame citológico geralmente é dada em cruzes².

MATERIAL E MÉTODOS

Material: registros do laboratório de hematologia do Hospital Universitário de Florianópolis. Os registros ava-

liados foram de pacientes atendidos no hospital no período de março de 1998 a julho de 1999, totalizando 97 exames.

Métodos: inicialmente foi realizada uma seleção dos registros da citologia nasal. Nos registros coletados obteve-se dados de sexo e citologia diferencial dos 97 exames avaliados. A revisão bibliográfica sobre citologia nasal na rinite no referente ao período de 1977 a 1998, foi realizada na biblioteca setorial do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação citológica das secreções nasais em exames realizados em pacientes atendidos no laboratório do Hospital Universitário de Florianópolis. O trabalho teve um total de 97 exames avaliados.

Os resultados obtidos foram comparados com citações bibliográficas, no que diz respeito a citologia da secreção nasal. Nenhum diagnóstico foi definido pois, como exposto no trabalho, são necessárias várias etapas, desde anamnese até outros exames complementares, para definição da etiologia da rinite.

Nos dados coletados observou-se um certo equilíbrio entre os dois sexos, com uma pequena vantagem do sexo masculino, (Figura I).

No número de células contadas, observou-se em 7 dos 97 exames avaliados um predomínio de eosinófilos (> 30%). As secreções nasais dos pacientes alérgicos são ricas em eosinófilos e a eosinofilia periférica com elevações relacionadas com as exacerbações clínicas, é uma característica comum⁴. Nas rinites, uma proporção de eosinófilo nas secreções, maior que 30% do total de células leucocitárias significa processo alérgico².

Dos 97 exames avaliados, 46 apresentaram ausência de eosinófilos, 37 com número de eosinófilos inferior a 10% e 7 com número entre 11 e 29%, mostrando um predomínio de neutrófilos, (Figura II). Neutrofilia local ou sistêmica indica uma infecção⁴.

AGRADECIMENTO

Ao setor de hematologia do Hospital Universitário de Florianópolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett, J. C.; Plum, F. Cecil: *Tratado de Medicina Interna*. 20ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998, 1563-1566 p., V. 2.
2. Carvalho, L. P.; Rios, J. B. M. *Alergia Clínica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, 142-145 p.
3. Costa, S. S.; Cruz, O. L. M.; Oliveira, J. A. A. et al. *Otorrinolaringologia: Princípios e Prática*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994, 309p.
4. Fauci, A.; Braunwald, E.; Isselbacher, K. J.; Wilson, J. D.; Martin, J. B.; Kasper, D. L.; Hauser, S. L.; Longo, D. L. *Harrison Medicina Interna*. 14ª ed. Rio de Janeiro, MacGraw - Hill, 1998, 1982-1983 p., V. 2.
5. Jafek, B. W.; Stark, A. K. *Segredos em Otorrinolaringologia*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1998, 117-118 p.
6. Naclerio, R.; Solomon, W. *Primer em Alergia e Imunologia: Rinite e Alergenos Inalatórios*. JAMA 1997; 278: 1842-1848.
7. Negreiros, E. B.; Almeida, C. A. D.; Ungler, C. E. *Alergia: Para Clínicos e Pediatras*. Rio de Janeiro, Atheneu, 1977, 143-145 p.
8. Mackay, I. S.; Durham, S. R. - Perennial rhinitis. *BMJ* 1998, March; 316: 917.
9. Parikh, A.; Scadding, G. K. - Fortnightly review: seasonal allergic rhinitis. *BMJ* 1997 May; 314: 1392.

PRÊMIO BIOSYSTEMS

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Biosystems" é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio da Biosystems do Brasil;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 1.500,00 (mil e quinhentos reais) na data do Congresso, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue durante os Congressos Brasileiros de Análises Clínicas.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio Biosystems" tem por objetivo:

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Análises Clínicas no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho de Tema Livre apresentado nos Congressos Brasileiros Análises Clínicas, sobre diabetes.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao "Prêmio Biosystems", os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 45 dias antes do Congresso, 5 (cinco) cópias do trabalho original completo, atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, *summary* em inglês, palavras chaves (unitermos) e *key words* (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e serem originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será publicado com exclusividade na Revista Brasileira de Análises Clínicas e deverá ser obrigatoriamente apresentado pelo autor (ou autores) aos congressistas do CBAC em que foi premiado, em dia e hora determinados pela Comissão Julgadora do Prêmio e Comissão Organizadora do CBAC. Para isto, é necessário que o(s) autor(es) compareça(m) ao Congresso preparado(s) para fazer tal apresentação com slides, transparências e outros recursos que o(s) autor(es) julgar(em) pertinente(s);
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora ao Prêmio Biosystems, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 4 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 5 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será escolhida antecipadamente e publicada no programa oficial do Congresso;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 3 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o "Prêmio Biosystems", e aos outros 2 (dois), um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A Comissão Julgadora anunciará a sua decisão final após avaliar todos os trabalhos apresentados;
- 5) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O trabalho enviado para concorrer ao "Prêmio Biosystems" que não for apresentado na sessão de Temas Livres do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, será desclassificado;
- 3) O trabalho concorrente ao prêmio deve ser apresentado na sessão de Temas Livres obrigatoriamente por um dos autores do trabalho regularmente inscrito no Congresso;
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 1996.

Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Presidente

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio BIOSYSTEMS

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro • RJ • 20270-340

e-mail: congresso@sbac.org.br

Formação de agentes multiplicadores em doenças parasitárias

The formation of multiplier agents in parasitic diseases

Dina Lúcia Morais Falavigna*, Ana Lúcia Falavigna Guilherme*,
Silvana Marques de Araújo*, Áurea Regina Teles Pupulim*,
Maria Luíza Gaspar Goulart Dias* & Nadir Rodrigues Marcondes*

RESUMO - A educação em saúde deve fundamentar-se no próprio meio em que o indivíduo vive. Pessoas que pertencem a comunidade podem tornar-se peças-chave para a consolidação de campanhas de esclarecimento e prevenção de doenças infecciosas e parasitárias. Objetivando uma facilitação de aprendizagem de conhecimentos específicos na área de saúde e com a finalidade de estimular profissionais da área de ensino, saúde e líderes comunitários a se tornarem agentes multiplicadores, foram ministrados 12 cursos teórico-práticos de 30 horas/aula cada. Descreve-se aqui a forma de condução do processo educativo: escolha da população-alvo, análise da situação, estratégias didáticas adotadas e produção de material instrucional. Acredita-se que as próprias comunidades possam desenvolver a longo prazo, através da monitoração de agentes multiplicadores, uma consciência crítica que promova melhorias na qualidade de vida da população e que leve à prática efetiva da cidadania.

PALAVRAS-CHAVE - Educação em saúde; agentes multiplicadores; comunidades

ABSTRACT - The population health education must be based on their own environment. Persons belonging to the community can become key-pieces to enlightenment and prevention campaigns of infectious and parasitic diseases. Having on mind a specific knowledge learning of the health area and aiming to encourage education and health professionals and community leaders to become multiplier forming, it was offered twelve theoretical and practical courses of 30 hours each. We describe here the development of the educational process: the target population choice, situation analysis, didactic strategies adopted and educational materials production. We believe the communities can develop, in long term, through the multiplier agents monitoration, a critical conscience that promotes an improvement of the life quality and leads to the effective practice of the citizenship.

KEY WORDS - Health education; multiplier agents; communities.

INTRODUÇÃO

A saúde é uma preocupação crescente frequentemente inserida como um dos objetivos gerais da educação. Deve, por isso, ser enfatizada desde o nível primário de ensino, fundamentando-se na realidade vivenciada (Pedrazanni *et al*, 1989; Andrade e Coelho, 1997) e na conscientização da comunidade de que a educação em saúde depende de um processo de ação coletiva (Mello *et al*, 1992; Carandina e Magaldi, 1989). Assim, a participação dinâmica de forma consciente e engajada de seguimentos expressivos da população deve ser incentivada a fim de consolidar campanhas de esclarecimento e prevenção de doenças infecciosas e parasitárias (OMS, 1982). Do mesmo modo, a escola, seja ela de 1º, 2º ou 3º grau, surge como polo integrador de ações concretas e como instrumento facilita-

dor da participação da comunidade nos problemas de saúde que lhe aflige.

Este trabalho propôs-se à formação de agentes multiplicadores em doenças parasitárias, utilizando diferentes estratégias pedagógicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho educativo desenvolveu-se através da oferta de cursos teórico-práticos para professores de pré-escola e de 1º grau, trabalhadores assíduos de saúde (auxiliares de enfermagem, técnicos e auxiliares de laboratório), líderes comunitários e de Pastorais de Saúde. Os cursos eram compostos de módulos de 30 horas/aula com um máximo de 40 e um mínimo de 5 vagas por curso, sendo realizados durante os anos de 1996 e 1997.

Recebido em 22/10/99

Aprovado em 28/01/2000

*Departamento de Análises Clínicas - Universidade Estadual de Maringá

Projeto financiado pelo Programa de Extensão do Ministério da Educação e Cultura (Proext-MEC/96). Processo N.º 1825/96 - UEM

Os cursos foram ministrados por acadêmicos dos cursos de Farmácia, Medicina, Enfermagem e Odontologia supervisionados por professores da área básica de Parasitologia. Tinham um programa pautado em uma linha de ação prática e reflexiva, sobre as experiências vivenciadas pelos participantes e a realidade vigente. Os trabalhos foram conduzidos utilizando-se de dinâmica de grupo. As colocações foram feitas resgatando o "saber popular" que a população-alvo dominava sobre a temática e articulando-o com conhecimentos científicos e técnicos. Dessa forma foi estabelecida uma estreita cooperação entre os coordenadores, ministrantes e os participantes.

• Recursos didáticos utilizados

1. Vídeos e slides sobre o corpo humano (visando a localização e a fisiologia dos órgãos utilizados como habitat de parasitas) e sobre os parasitas (ciclo evolutivo, epidemiologia, alterações patológicas, sintomas e medidas de controle);

2. Peças anatômicas com parasitas, parasitas conservados, lâminas permanentes, parasitas vivos;

3. Manual de orientação em parasitoses.

Para operacionalizar a nossa proposta, o trabalho educativo foi desenvolvido em 4 etapas:

1ª) resgate do conhecimento, atitudes e percepções da população-alvo sobre o assunto;

2ª) planejamento e realização dos cursos;

3ª) produção de material instrucional;

4ª) divulgação dos materiais produzidos e dos conhecimentos adquiridos em feiras de saúde, jogos, apresentação de peças teatrais, etc.

RESULTADOS

A população alvo foi formada por 306 indivíduos, dos quais 88,6 % eram mulheres e 11,4 % homens. A idade média foi de 32 anos, compreendendo uma faixa etária de 18 a 52 anos. Quanto ao grau de instrução, 7(2,28%) tinham o 1º grau incompleto, 17(5,56%) 1º grau completo, 29(9,48%) segundo grau incompleto, 167(54,58%) 2º grau completo e 86(28,10%) curso universitário. Com relação a ocupação, 201(65,68%) eram professores de 1º grau, 40(13,07%) professores de pré-escola, 22(7,19%) eram auxiliares de enfermagem, 13(4,25%) técnicos de laboratório, 16(5,23%) auxiliares de laboratório e 14(4,58%) líderes de comunidades civis ou religiosas. A clientela e sua origem foram relacionadas na Tabela 1.

O resgate do conhecimento, de atitudes e da per-

TABELA 1
Cursos teórico-práticos realizados visando a formação de agentes multiplicadores

Cidade	Escola	Clientela atendida
Sarandi	Hioshi Yahiasi	20 professores de 1º grau
Maringá	Maria Balani	30 professores de 1º grau
Maringá	Ney Braga	25 professores de 1º grau e 2 líderes comunitários
Juranda	Escolas municipais	28 professores de 1º grau e 6 de 2º grau (sede, distritos, rurais)
Maringá	Escolas municipais	40 professores de pré-escola
Maringá	Pastoral da Saúde	5 líderes dos bairros Hortência e Taís I e II
Rolândia	Escolas municipais	28 professores de 1º grau e 8 trabalhadores de saúde
Sarandi	Município	20 trabalhadores de saúde
Juranda	Município	17 trabalhadores de saúde
Floraí	Maria E. Pedroni	30 professores de 1º grau
Floraí	Pastoral da Saúde	7 líderes
Maringá	Município	40 professores de Ciência de 1º grau

cepção da população-alvo, feito uma semana antes da realização dos cursos, serviu de base para o planejamento e direcionamento dos temas trabalhados. De uma maneira geral, as necessidades apontadas diziam respeito ao conhecimento de doenças parasitárias, elaboração de programas para controle da transmissão de parasitoses e estratégias de montagem de campanhas de educação em saúde.

O material pedagógico produzido foi utilizado dentro das salas de aula, em feiras de saúde e como sugestão para trabalhos com crianças em ruas de lazer, passeatas e peças de teatro. Este material constou de textos, cartazes, vídeos e jogos onde as informações científicas foram somadas ao conhecimento popular e adaptadas ao nível da clientela à qual seria aplicada.

DISCUSSÃO

Ao aplicar diferentes estratégias educativas à formação de agentes multiplicadores, acreditamos ter proporcionado oportunidade para reflexão sobre medidas de intervenção na transmissão de doenças infecciosas e parasitárias, objeto deste artigo. Partimos da premissa básica de que essa ação pudesse contribuir para desenvolver no indivíduo e no grupo a capacidade de analisar criticamente sua realidade, a partir da qual pudesse planejar ações que minorassem problemas e modificassem situações existentes. Dessa maneira, procuramos conscientizar de tal forma os envolvidos para que pudessem ser sujeitos ativos de mudanças concorrentes para a melhoria das condições de saúde.

Um dos pontos estabelecidos sobre a educação de adultos é que eles trazem uma grande quantidade de

experiências de suas vidas para a sala de aula. Esta é uma vantagem que deve ser reconhecida e usada. Buscamos, ao introduzir conhecimentos científicos, reordenar o "saber popular" no sentido de desmistificar conceitos vagos, difusos ou inverídicos. Acreditamos ter sido possível a passagem de um nível de saber popular para outro de maior complexidade, através do uso da realidade vivenciada. Segundo Andrade *et al* (1996) a aprendizagem pode ser comparada a um movimento contraditório, em que a experiência é fundamental para a realização de novos e mais complexos processos de aprendizagem. Seguindo a mesma idéia, Dreyden e Vos (1996) afirmam que aprendemos 10% do que lemos, 15% do que ouvimos e 80% do que vivenciamos. A quantidade e diversidade de material didático produzido reflete a apropriação dos conhecimentos científicos e sua aplicabilidade aos outros níveis da comunidade.

O envolvimento de acadêmicos nestes projetos é útil na formação de um profissional de saúde contextualizado com as necessidades básicas da população, adaptados à vivência da realidade que os cerca.

O trabalho de formação de multiplicadores incluindo professores de pré-escola e de 1º grau baseia-se fundamentalmente na idéia de que a transformação da criança concorre para a modificação da sociedade, quer seja a nível de incorporação de conhecimentos com mudanças de atitudes ou de exigências de direitos na prática da cidadania. Da mesma forma, técnicos e auxiliares em saúde e líderes comunitários, por sua proximidade e influência junto à população também são agentes interferentes e estimuladores de práticas que levem a um incremento nas condições de vida da população.

A estratégia de ter como tarefa a produção de material instrucional na forma de jogos, palavras cruzadas, estórias, peças de teatro, baseou-se na afirmação de que aprender qualquer coisa pode ser divertido desde que o assunto seja apresentado e ensinado como um jogo (Dreyden e Vos, 1996). Lembrem ainda estes autores que alguns alunos são extremamente visuais, outros

são auditivos e outros são cinestésicos, aprendendo através do movimento de seus corpos. Assim, exemplificam que os diferentes estilos de aprender (ou apreender) requerem instrumentos adequados a cada um.

Entretanto, a eficácia da transmissão de conhecimentos e de mudanças comportamentais ocorridas na comunidade e na qualidade dos serviços de saúde só poderá ser efetivamente avaliada a longo prazo, desde que modificações de outras variáveis, como melhoria em serviços de saúde, de água e esgoto e de coleta de lixo, forem tentadas conjuntamente.

Neste sentido, a ação educativa precisa realizar-se num contexto global, embora não deva ser descartada a utilização de qualquer instrumento isolado que promova o aumento do conhecimento e leve o indivíduo à prática efetiva da cidadania.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade, V.; Coelho, M.A.S.M. O processo educacional na promoção de ações comunitárias em Saúde. *Rev. Bras. Cancerol.*, vol.43, n.1, p.57-63, 1997.
2. Carandina, Luana & Magaldi, Cecilia. Análise das condições de saúde e de vida da população urbana de Botucatu, SP (Brasil). II - Conhecimentos e opiniões da população sobre sintomas de Doenças. *Rev. Saúde Públ.*, vol.23, n.3, p.196-206, 1989.
3. Dreyden, Gordon & Vos, Jeannette. *Revolucionando o aprendizado*. São Paulo, Makron Books, 1996, 500 pp.
4. Mello, Dalva A.; Pedrazzani, Elisete S.; Pizzigati, Clemência P. Helminthoses intestinais: o processo de comunicação e informação no programa de educação e saúde em verminose. *Cad. Saúde. Públ.*, vol.8, n.1, p.77-82, 1992.
5. Organization Mondiale De La Santé. Groupe Scientifique de Infections Intestinales à Protozoaires et à Helminthos. *Rapport*, Geneve, 1982 (Series de Rapports Techniques, 666)
6. Pedrazzani, Elisete S.; Mello, Dalva A.; Pizzigati, Clemência P.; Pripas, Sérgio; Fucci, Marta; Santoro, Maria Cristina M.. Helminthoses intestinais. III - Programa de educação e saúde em verminose. *Rev. Saúde Públ.*, vol.23, n.3, p.189-95, 1989.

Endereço para correspondência

Dina Lúcia Moarais Falavigna

Av. Colombo 5790 - 87020-900 - Maringá, PR. Fone0.xx.44.261-4347.

Fax 0.xx.44.263-7440

E-mail: falavigna@wnet.com.br

Curso preparatório

Credenciamento do Sistema da Qualidade

A SBAC irá realizar durante o XXVII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, um curso preparatório para o laboratório implantar o Sistema da Qualidade, com ou sem o objetivo de alcançar o credenciamento.

Assim como todos os organismos de certificação que fornecem treinamento para os interessados no reconhecimento de um Sistema da Qualidade, a SBAC, atuará dentro desse mesmo princípio e objetivo: treinar os interessados, para alcançarem o credenciamento da SBAC.

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Rua Vicente Licínio, 95 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-340 Tel.: (21)264-4449/234-4881
e-mail: credenciamento@sbac.org.br

PRÊMIO DOLES

de Bioquímica Clínica

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica" é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio da Doles Reagentes;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a 20(vinte) salários mínimos da data da outorga, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica" tem por objetivo:

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Bioquímica Clínica no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas, com vistas à melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 45 dias antes do Congresso, 5 (cinco) cópias do trabalho original completo, atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e serem originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas e deverá ser obrigatoriamente apresentado pelo autor (ou autores) aos congressistas do CBAC em que foi premiado, em dia e hora determinados pela Comissão Julgadora do Prêmio e Comissão Organizadora do CBAC. Para isto, é necessário que o(s) autor(es) compareça(m) ao Congresso preparado(s) para fazer tal apresentação com slides, transparências e outros recursos que o(s) autor(es) julgar(em) pertinente(s);
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora ao "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica", poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 4 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 5 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 3 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica", e aos outros 2 (dois), um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecurável.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica" é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O trabalho inscrito mas não apresentado na sessão de Temas Livres do Congresso, será desclassificado para concorrer ao "Prêmio Doles de Bioquímica Clínica";
- 3) O trabalho concorrente ao Prêmio, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres obrigatoriamente por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 1997.

Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Presidente

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio DOLES de Bioquímica Clínica

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro • RJ • 20270-340

e-mail: congresso@sbac.org.br



PNCQ.

Qualidade até no nome.

O maior e o melhor programa de Controle da Qualidade existente no País, agora também é o primeiro a obter a certificação pela ABNT/NBR ISO 9002.

Qualificação e eficiência a serviço de clientes como você.



Programa Nacional de Controle de Qualidade Ltda.