

# RIBAC

## REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

### SUMÁRIO

#### PRÊMIO LABTEST

- Desempenho e custo de conjuntos para diagnóstico de marcas diferentes, presentes no mercado nacional, para dosagem de colesterol ..... 179**

*E. M. Hermes & R. W. Samohyl*

Performance and cost from different trademarks sets for diagnosis of Total Cholesterol present in the Brazilian market

#### PRÊMIO DOLES

- Efeitos dos fitoestrógenos da soja e da terapia de reposição hormonal sobre a formação de \*NO, homocisteína e óxidos de colesterol em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas ..... 185**

*Isabela Rosier Olimpio Pereira; André Arpad Faludi; Marcelo Chiara Bertolami; Maria Fernanda Campos; Najara Novaes; Simone Ferderbar; José Mendes Aldrighi & Dulcineia Saes Parra Abdalla*

Effect of soy phytoestrogens and hormonal replacement therapy on NO, homocysteine and cholesterol oxides formation in postmenopausal hypercholesterolemic women

- Carga viral de HPV de alto risco por captura híbrida e lesões intra-epiteliais escamosas cervicais ..... 193**

*José Eleutério Junior; Diane Isabelle Magno Cavalcante; Fabrícia Martins Teixeira & Renata Mirian Nunes Eleutério*

High risk HPV viral load by hybrid capture and cervical intraepithelial lesions

- Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro ..... 195**

*Marcelo Silva Marinho; Grazielle Brito da Silva; Carla Andresa Diele & João Bezerra de Carvalho*

Schoolchildren intestinal parasitosis prevalence in Seropédica, Rio de Janeiro

- Sepse relacionada ao uso de cateter intravascular ..... 197**

*T. B. Filippin; F. B. Nunes; T. A. Castaman; R. C. V. Santos; J. C. F. Alves Filho & J. R. Oliveira*

Intravascular catheter - related sepsis

- Deteção de  $\beta$ -globina PCR em amostras citológicas cérvico-uterinas: estudo retrospectivo ..... 201**

*Sônia Maria Miranda Pereira; Marina Yoshiê Sakamoto Maeda; Alda Wakamatsu; Suely Nonogaki;*

*Cecília Rotelli-Martins & Adhemar Longatto Filho*

PCR  $\beta$ -globin detection in cytological uterine cervix samples: retrospective study

#### PRÊMIO HOTSOFT

- Displasias ectodérmicas do grupo A: elaboração de um banco de dados informatizado para auxílio ao diagnóstico genético-clínico ..... 205**

*Toni Lisboa Costa; Nina A. B. Pagnan; Newton Freire-Maia; Remy Lessnau & Eduardo E. Sordi*

- Efeito de *Monascus* sobre os constituintes sanguíneos em coelhos ..... 213**

*T. T. de Oliveira; T. J. Nagem; R. M. Lopes; G. H. K. Moraes; R. R. da Silva & M. R. da Costa*

*Monascus effects in rabbit's blood serum constituents*

- O antígeno prostático específico e sua importância na decisão clínica no câncer de próstata ..... 221**

*Anelise S. Marchesan; Alan A. Azambuja; Patrick Gaspareto; Márcio de Assis;*

*Melissa Guerra Simões Pires & Jarbas Rodrigues de Oliveira*

The prostatic specific antigen and its importance in the clinical decision in the prostate cancer

- Avaliação comparativa entre duas técnicas sorológicas para HIV em pacientes com diferentes níveis de carga viral ..... 225**

*Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino, Fabia Emanuelle Lopes de Medeiros, Renata Gomes Alves,*

*Yvana Trindade Almeida, Ralfo Cavalcante de Medeiros & Valéria Cristina Ribeiro Dantas*

Comparative evaluation between two serologic techniques to HIV in patients with different levels viral

- Estudo retrospectivo de 145 casos de *Tinea capitis* na população de João Pessoa-Paraíba ..... 229**

*Patrícia Marques Lima Pessoa de Aquino & Edeltrudes de Oliveira Lima*

Retrospective study in 145 cases by *Tinea capitis* from the population in João Pessoa-Paraíba

- A leishmaniose tegumentar sob a perspectiva do paciente: resultado de uma prática educativa ..... 233**

*M. T. G. Casavechia; S. M. de Araújo; J. J. V. Teixeira & M. V. C. Lonardoni*

Cutaneous leishmaniasis under the patient's perspective: an educational practice result

# 4

VOLUME 34

2002

# Desempenho e custo de conjuntos para diagnóstico de marcas diferentes, presentes no mercado nacional, para dosagem de colesterol

## Performance and cost from different trademarks sets for diagnosis of Total Cholesterol present in the Brazilian market

E. M. Hermes<sup>1</sup> & R. W. Samohyl<sup>2</sup>

**RESUMO** – O objetivo da presente trabalho é avaliar o desempenho quanto a qualidade e custo de dezessete marcas dos conjuntos para diagnóstico *in vitro* de Colesterol Total presentes no mercado brasileiro. Foram utilizados como amostra o soro controle Qualitrol® HS P 452. Os resultados foram submetidos a uma ANOVA para verificar se havia diferenças significativas entre as marcas analisadas. O teste de Duncan foi utilizado para agrupá-las, conforme suas diferenças. Os resultados obtidos pela ANOVA demonstraram existir diferenças significativas ao nível de 5%. As marcas de conjuntos para diagnóstico analisadas formaram agrupamentos que são significativamente diferentes entre si, ao nível de 5%. Não foi observada relação positiva entre o custo e o desempenho das marcas de conjunto para diagnóstico *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE** – Desempenho, custo, colesterol, conjunto para diagnóstico *in vitro*.

**SUMMARY** – The objective of the present work is to evaluate the quality performance and cost of 17 trademarks for diagnosis *in vitro* of Total Cholesterol present in the Brazilian market. The serum control Qualitrol® HS P 452 was used as sample. The results were submitted to an ANOVA test to verify the significance at a level of 5% of the averages of the absolute difference of the analyzed trademarks. The Duncan test was used to group them, according to their differences. The results obtained from the ANOVA showed that there are significant differences at a level of 5%. The trademarks formed groupings that are significantly different, at a level of 5%. No relation between the cost and the performance of the set trademarks for the diagnosis *in vitro* was observed.

**KEYWORDS** – Performance, cost, cholesterol, set for diagnosis *in vitro*.

### INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, os métodos analíticos quantitativos utilizados em Laboratórios Clínicos têm se tornados mais confiáveis e mais padronizados. Com isso, se torna necessária a evolução dos procedimentos de avaliação destes mesmos métodos e correlatos usados para a sua fabricação. Tem-se reconhecido que o rendimento de um método pode ser considerado objetivamente como aceitável somente se seus erros são suficientemente pequenos para uso clínico. Protocolos desenvolvidos por Westgard, pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration - FDA*) e pelo Comitê Nacional para Padrões em Laboratório Clínico (*National Committee for Clinical Standards - NCCLS*) medem os erros em termos de unidades de concentração da variável analítica e compara-os com os erros clinicamente admissíveis (Westgard, 2000) (NCCLS, 1998).

Quando um fabricante desenvolve um novo método e o prepara para lançar no mercado, a FDA requer que ele indique o rendimento analítico do método,

especificamente quanto à precisão e à exatidão deve ser apoiado pela avaliação experimental do método. É essencial que os dados sejam realistas e claros. O nível de rendimento dos métodos nos laboratórios que os utilizam deve ser, pelo menos, tão bom quanto o indicado pelo fabricante.

No Brasil, o órgão responsável pelo controle da fabricação, importação e da qualidade dos conjuntos para diagnóstico *in vitro*, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde que vem aprimorando sua atuação na área de controle de reagentes definidos na legislação atual como correlatos.

As Boas Práticas de Fabricação e Controle, constituem os requisitos que devem ser adotados pelas empresas fabricantes e importadoras de produtos correlatos, visando a garantir a qualidade do sistema de produção e fornecimento de seus produtos e a garantia da qualidade é realizada pelos inspetores da vigilância sanitária. A portaria SVS nº 686 de 27/08/98 internaliza a resolução Mercosul GMC nº 65/96, que estabelece os requisitos para as Boas Práticas de Fabrica-

Recebido em 9/7/2002

Aprovado em 11/7/2002

Prêmio LABTEST - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

<sup>1</sup>Farmacêutica Bioquímica – Mestre em Engenharia de Produção - LAC do H U da Universidade Federal de Santa Catarina;

<sup>2</sup>Professor PhD da Engenharia de Produção e Sistemas da Universidade Federal de Santa Catarina.

ção e Controle em estabelecimentos de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

O controle de qualidade dos conjuntos para diagnóstico *in vitro*, ou "kits", como comumente são chamados nos meios laboratoriais, na área de imunologia, é de responsabilidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (FioCruz).

Os compradores dos conjuntos para diagnóstico *in vitro*, no caso os laboratórios, que utilizam diversos métodos ao selecioná-los, comparam as indicações de diferentes fabricantes de maneira que estas devam ser competitivas quanto ao custo e à qualidade. O NCCLS (1986, 1995, 1996, 1998, 1999) desenvolveu protocolos para que sejam utilizados pelos fabricantes nas provas experimentais dos métodos e no tratamento estatístico dos dados.

Outras organizações estudam métodos para verificar as indicações do fabricante acerca do rendimento analítico de um método. A FDA publicou protocolo com a intenção de provar se o rendimento de qualquer método comercial (dispositivo ou conjunto de diagnóstico *in vitro* - "kits") coincide com as indicações do fabricante (Koch and Peters, 1999).

O usuário dos métodos deve avaliar, o mais eficientemente possível, se o rendimento é aceitável, e descartá-lo com um mínimo de trabalho experimental. Por isso, existe a necessidade do desenvolvimento de metodologias práticas que possam informar o desempenho de um método e possam ser executadas por todos os laboratórios, não importando se os mesmos são de porte pequeno, médio, ou grande.

A importação dos conjuntos para diagnóstico laboratorial de várias marcas de diversos países que estão no mercado chega ao usuário competindo em preço, resta aos profissionais levarem em conta a relação custo e qualidade de tais produtos. Os conjuntos para diagnóstico laboratorial, que chegam ao mercado de diversas procedências com a mesma metodologia, variam na quantidade de insumos presentes (substratos, enzimas, coenzimas, cofatores) muitas vezes com resultados variáveis em faixas que excedem os valores de referência. O cliente, que utiliza o produto na maioria das vezes, não consegue avaliar do ponto de vista custo/qualidade, optando então pelo menor preço.

A partir de 1999, o Governo Federal, através do Ministério da Saúde, estabeleceu como meta o controle de qualidade de todo o sangue coletado no país, através do projeto: implantação da qualidade total na Hemorrede (Programa de Qualidade do Sangue do Ministério da Saúde, 1999). Para atingir esta, meta vários comitês técnicos foram criados para implantar, entre outras atividades, o controle de qualidade dos reagentes e insumos, e, também, um programa de avaliação externa da qualidade de todas as Unidades Hemoterápicas do país.

Tais fatos demonstram, claramente, a intenção do Ministério da Saúde em investir cada vez mais na área de Controle de Qualidade de reagentes utilizados no diagnóstico laboratorial, visando, inclusive, ao aperfeiçoamento do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, preparando-se para a efetiva atuação do Mercosul.

Os laboratórios de Análises Clínicas se deparam muitas vezes com a necessidade de avaliar o melhor

"kit" para a dosagem de um analito, quando precisam introduzir uma nova metodologia, ou quando é necessária a troca do conjunto para o diagnóstico *in vitro* ("kit"), usando a mesma metodologia. A avaliação é feita com base nas informações dos fabricantes disponíveis nas bulas dos respectivos "kits", em conjunto com o custo que o referido produto apresenta. Segundo as BPLC ou Boas Práticas de Laboratório Clínico, os laboratórios devem testar cada novo "kit" ou metodologia antes de introduzi-la na rotina. (Mendonça, 1998).

Este trabalho tem como objetivo traçar um perfil de 17 marcas estudadas de conjuntos para o diagnóstico *in vitro* ("kits") para a dosagem de colesterol existente no mercado nacional, destinados aos Laboratórios de Análises Clínicas. A escolha do analito colesterol deve-se ao fato de ser um exame muito importante para a detecção do risco para doenças coronarianas. As doenças do coração se configuram na maior causa de morte no mundo e no Brasil. O exame para colesterol é solicitado para a prevenção, detecção ou triagem, e as diferenças nas dosagens existentes entre laboratórios ou marcas podem acarretar decisões equivocadas por parte dos clínicos.

O custo não deve ser prioritário em função da qualidade, mesmo porque um produto de baixa qualidade pode mostrar-se com imprecisão e com desempenho pobre em termos de exatidão, gerando um grande número de resultados não-conformes, que reduzem a utilidade médica dos resultados e aumentam a repetição dos ensaios. Isto pode gerar uma elevação dos custos para níveis muito maiores que os necessários para adquirir reagentes de custo mais elevado. No entanto, muitas vezes essa confirmação só se estabelece após a aquisição dos produtos. De fato, uma avaliação do custo-benefício é fundamental, durante o processo de escolha da marca do reagente a ser utilizada.

Com o intuito de padronizar e orientar a qualidade no campo da medicina laboratorial e sistemas de diagnóstico *in vitro*, foi proposto em 1995 através da Organização Internacional para Normalização Técnica (*International Organization for Standardization - ISO*), a criação de um comitê técnico denominado ISO/TC-212, que contempla a qualidade, a administração, procedimentos pré e pós-analíticos, desempenho analítico, segurança laboratorial, sistemas de referência (NCCLS, 2000). Com a introdução no Brasil dos Programas de Acreditação é possível perceber mudanças na cultura, no que diz respeito à qualidade dos serviços de saúde. Os programas de acreditação são realizados, no Brasil, pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC), pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e também por um órgão internacional, o *College of American Pathologists* (CAP).

Em países como Estados Unidos da América e Canadá, existem publicações que informam o desempenho de hospitais, profissionais da saúde e organizações que prestam serviços de assistência médica que são de difícil compreensão, ou não confiáveis (Shcolnik, 2000). Na prática, servem no incremento da Melhoria Contínua da Qualidade das organizações. Porém, a divulgação de informações, de forma séria e científica, pode auxiliar usuários na melhor escolha dos produtos, ou serviços laboratoriais.

A preocupação com a qualidade dos conjuntos de diagnóstico se verifica em alguns setores de laborató-

rio como na Imunologia, com os trabalhos publicados por Rajner *et al.* (1999). A comparação de desempenho em diferentes metodologias para testes sorológicos, para sífilis, demonstrou diferenças evidentes (Bazzo, 1999).

Alguns trabalhos referem-se à análise do custo-benefício de testes laboratoriais (Mayer *et al.*, 1998). Trabalhos de comparação da qualidade de fitas reagentes para exame químico em urinalise demonstram diferenças entre marcas (Treitinger, 1999). Com a Bioquímica Clínica são verificados trabalhos que comparam metodologias diferentes (Keijzer *et al.*, 1999) ou sistemas (Johnson *et al.*, 1999).

Segundo Juran (1993), existe um consenso de que o preço do produto possui alguma relação racional com a qualidade, porém pesquisas feitas sobre o assunto mostram relações confusas. Ainda para o mesmo autor "como não têm informações objetivas sobre a qualidade, os clientes dão importância à imagem projetada pelo fabricante e pelos comerciantes, através de sua publicidade e promoções" com os laboratórios, o mesmo fato acontece baseado na confiança que pode não refletir a realidade. O preço em si pode ser considerado por muitos como um índice de qualidade e as empresas podem utilizar essa crença como parte de suas estratégias de marketing. É importante salientar que alguns produtos são similares em termos de metodologia, mas é possível que tenham desempenhos diferenciados. Apesar das empresas utilizarem a crença da relação positiva entre preço e qualidade, na prática pode não ser verdade. No entanto, os responsáveis pela aquisição nem sempre possuem informações sobre todos os materiais.

Segundo Juran (1993), a qualidade "...é interpretada como a inclusão de fatores que vão além das características funcionais inerentes ao produto." Sendo que preço é "interpretado como sendo relacionado ao valor e é pago por aqueles fatores adicionais juntamente com as características funcionais inerentes. Alguns produtos são aparentemente similares, mas têm desempenhos diferentes. É possível, através da coleta apropriada de dados, traduzir a diferença tecnológica para a linguagem monetária, ou para outras formas significativas."

Quando se almeja a melhoria da qualidade de um processo avaliar o custo/benefício de reagentes e "kits" tornar-se uma tarefa difícil nas organizações públicas, se a avaliação for feita apenas pela questão do menor preço. Como foi citado anteriormente por Juran (1993) fatores podem estar inseridos, como por exemplo o marketing, e obscurecerem a avaliação final para a escolha do melhor produto. Nesse sentido, a ocorrência de retrabalho ou resultados que não auxiliem apropriadamente a decisão médica, resultam em um aumento do custo final em qualquer tipo de organização.

Devido à importância e facilidade da dosagem, os laboratórios e fabricantes devem se aprimorar para diminuir o máximo possível as fontes de variações. Estas podem ser divididas em fisiológicas e analíticas.

A variação fisiológica normal para o colesterol é de 6,5% (Rifai *et al.*, 1999). Esta variação independe do erro analítico e reflete mudanças na concentração que ocorrem no curso da vida. Algumas variações ocorrem devido à postura, deitado ou sentado, no momento da coleta (Miller, 1992). Mudanças na concentração tam-

bém são observadas nas mudanças de estado como gravidez, estresse e doenças agudas.

As variações analíticas são inerentes das próprias medidas e são devidos às amostras, ao volume, ao funcionamento dos instrumentos e equipamentos de medida, às incertezas dos valores dos materiais de calibração, materiais de controle, e ao próprio método. Essas fontes podem ser melhor observadas em processos de teste laboratorial e seus erros potenciais em *Tietz text book of Clinical Chemistry* (Westgard and Klee, 1999) e são de caráter aleatório ou sistemático.

Dados de 5500 laboratórios participantes de estudos de proficiência do Colégio Americano de Patologistas (*College of American Pathologists - CAP*) demonstram que diferenças existem entre laboratórios que utilizam "kits" diversos (Rifai *et al.*, 1999).

## MATERIAIS E MÉTODO

Foram utilizados 17 conjuntos de diagnóstico *in vitro* ("kits") de marcas diferentes.

A seleção dos conjuntos foi feita após consulta à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do Ministério da Saúde responsável pelo registro e controle de todos os produtos para diagnóstico *in vitro* do país. Após a consulta, foram selecionados os conjuntos para diagnóstico *in vitro* para dosagem do colesterol que utilizavam a metodologia enzimática colorimétrica. Dos 50 conjuntos para diagnóstico que foram relacionados, procedeu-se à verificação de quantos estavam disponíveis no mercado, pois alguns constam da relação, mas já não são mais produzidos ou importados. Foram adquiridos 17 conjuntos para diagnóstico *in vitro* dos 35 disponíveis no período da compra.

Os preços foram solicitados, por consulta via fax, a cada firma e posteriormente adquiridos através de compra direta. Os preços de cada conjunto para diagnóstico *in vitro* estão relacionados na Tabela III.

Os números de 1 a 17, correspondentes às marcas, e foram identificados conforme o critério da seleção em que foram colocados no aparelho de automação Cobas Mira® para realização das dosagens. A ordem de colocação foi realizada de forma aleatória por sorteio com as letras de A a Z, que constam no teclado no referido aparelho. As marcas dos conjuntos são dispostas em ordem alfabética e procede-se ao sorteio. Este se inicia com a retirada de uma letra para a primeira marca. As letras utilizadas para colocação das programações e realização das dosagens, foram: A, B, C, E, G, J, H, M, N, P, Q, R, S, T, W, Z e são referidas com os números de 1 a 16, conforme Quadro 1. Cada número corresponde a uma marca de conjunto específico. O conjunto número 17 é empregado no laboratório para dosagem de colesterol como rotina, e que é realizado no aparelho de automação Dade Dimension®.

As dosagens dos conjuntos para diagnóstico *in vitro*, cujas marcas correspondem aos números 1 a 16, foram realizadas no equipamento de automação Cobas Mira®, pertencente à Roche. As dosagens do conjunto para diagnóstico *in vitro* número 17 foram realizadas no equipamento Dade Dimension®, da *Dade International Chemistry System*. Foi realizado teste de precisão para o equipamento Cobas Mira®, conforme instrução do fabricante para verificar o seu perfeito funcionamento.

## Amostra

Consta de soro controle da marca Qualitrol® HS P lote nº 452 do laboratório Merck. O soro possui valor definido pela metodologia definitiva de Espectrometria de Massa de Isótopos Diluídos (EMID) para o analito colesterol. As amostras são um pool de plasma humano liofilizado.

A calibração dos conjuntos para diagnóstico *in vitro* de números 1 a 16, foi realizada pelo calibrador *System Multi-Test* (SMT) da Merck Diagnóstica lote nº 26039 com vencimento 28.02. 2003. A calibração do conjunto para diagnóstico *in vitro* número 17 foi realizada pelo calibrador *Chol Calibrator Dade*.

## Análise estatística

Para verificação da hipótese nula, de que todas as marcas possuem desempenho semelhante, foi empregado o teste F da análise de variância, ANOVA, com um fator (marca) considerando as amostras dos soros controles como blocos. Utilizou-se o programa computacional *SAS System*®. A variável resposta utilizada foi a média da diferença absoluta entre o valor observado e o valor teórico ideal do Soro Controle, para cada marca. Essa média, da diferença absoluta entre o valor observado e o valor teórico ideal, será designada, a partir deste ponto, como desvio do ideal.

Quando detectada a significância, ao nível de 5%, pelo teste F da ANOVA, realizou-se o teste de Duncan para comparar as marcas duas a duas (Montgomery, 1997) (Vieira, 1989).

Realizaram-se, ainda, análises exploratórias gráficas tipo diagrama de caixas para a visualização da distribuição das medidas com o programa estatístico *Statistic 6.0*®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela I, encontram-se os resultados da variância realizados pelo teste ANOVA utilizando o programa estatístico *SAS System* para o Soro Controle Qualitrol HS P 452. A variável resposta foi a diferença absoluta entre o valor observado e o valor teórico de média 183 mg/dl de colesterol, nos 30 dias de ensaio.

Os resultados do teste ANOVA demonstram que há diferenças significativas entre as marcas ao nível de significância de 5%. Observou-se também que há pequena significância entre os ensaios. Este fato evidencia que para este soro controle o efeito de formação de blocos, para os ensaios, foi útil para melhorar a precisão da comparação das médias dos tratamentos ou marca como citado por Montgomery (1997).

Como a variação, devido às marcas, mostrou valor F de 39,45 e valor p de 0,0001, referenciado anteriormente na da Tabela I, verificou-se que as marcas possuem diferenças significativas ao nível de 5%.

Como existem diferenças significativas nas médias do desvio do ideal das marcas, então há o interesse em descobrir quais marcas diferem, e, para isso usa-se o teste de Duncan, conforme pode ser visto na Tabela II.

Na Figura 1, é possível a visualização das médias do desvio do ideal para cada marca.

Como pode ser observado, verificaram-se 7 agrupamentos de médias que possuem diferenças significativas ao nível de 5%. Os agrupamentos são: A, B, C, D, E F e G, e, dentre estes, existem marcas que estão

**TABELA I**  
**Análise de variância para o soro controle HS P 452 para variável desvio do ideal**

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	f	Valor p
Marcas	16	9919,12	619,94	39,45	0,0001
Ensaio	29	815,08	29,11	1,79	0,0078
Resíduos	464	7291,82	15,72		
Total	509	18026,02			

**TABELA II**  
**Teste de Duncan para a variável desvio do ideal para soro controle HS P 452**

Agrupamento Duncan	Média Desvio do ideal	N	Marca
A	17,900	30	12
B	15,467	30	3
B	15,100	30	16
C	13,067	30	2
C	12,867	30	15
C	12,700	30	9
C	12,700	30	8
D	12,000	30	13
D	10,167	30	5
D	9,900	30	4
E	7,833	30	7
E	7,233	30	6
F	5,767	30	14
F	5,100	30	1
F	4,067	30	17
G	3,533	30	11
G	3,300	30	10

presentes em dois grupos. A presença de uma marca em dois grupos indica que não há diferença significativa da marca com os dois grupos.

Na Figura 2, pode ser visualizada a representação de Diagrama de caixa para as diferenças encontradas entre as dosagens de colesterol observadas para as 17 marcas estudadas, e o valor teórico ideal para o soro controle HS P 452 de 183 mg/dl.

Na seqüência, a Figura 3 mostra a representação de diagrama de caixa, para melhor análise exploratória, dos valores médios obtidos nas dosagens de colesterol para as 17 marcas estudadas.

Com a observação das Figuras 2 e 3, foi possível verificar que as marcas de números 7, 11 e 17, para o soro controle HS P 452, subestimam o valor de colesterol quando comparado com o valor teórico. Foi possível verificar que as marca de números 1, 3 e 7 possuem os maiores valores de desvio-padrão.

### Classificação das marcas estudadas, conforme seu grupo, realizada pelo teste de Duncan e custo por teste para o soro controle HS P 452

As médias do desvio do ideal das marcas foram dispostas em ordem decrescente, na Tabela III, que correspondem ao seu agrupamento conforme a classificação feita pelo teste de Duncan. Os dados desta tabe-

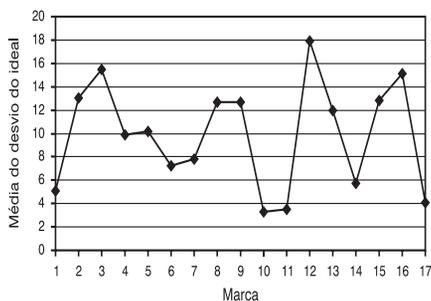


FIG. 1 - Análise gráfica das médias do desvio do ideal para cada marca com o Soro Controle HS P 452.

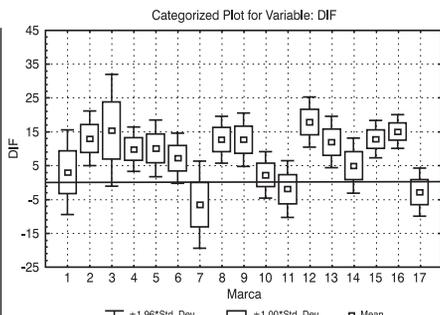


FIG. 2 - Medidas de tendência central e variabilidade para média e desvio-padrão das diferenças para as 17 marcas com o Soro Controle HS P 452.

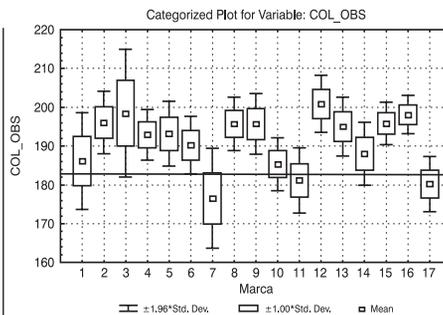


FIG. 3 - Medidas de tendência central e variabilidade para média e desvio-padrão do valor de colesterol observado para as 17 marcas com o Soro Controle HS P 452.

**TABELA III**  
Agrupamento das marcas e seu custo por teste em função das médias do desvio do ideal, para cada marca, com o soro controle HS P 452

Grupos	Marcas	Médias Desvio do ideal	Custo/teste	Reagentes (*)	Origem (**)
A	12	17,9	0,09	1	I
B	3	15,467	0,247	3	I
B	16	15,1	0,08	2	N
C	2	13,067	0,072	3	I
C	15	12,867	0,079	2	I
C	8	12,7	0,357	3	I
C	9	12,7	0,029	2	N
C-D	13	12	0,08	1	I
D	5	10,167	0,245	3	I
D	4	9,9	0,065	1	I
E	7	7,833	0,031	1	N
E	6	7,233	0,07	3	N
E-F	14	5,767	0,048	1	N
G-F	1	5,1	0,036	1	I
G-F	17	4,067	0,55	1	I
G	11	3,533	0,197	1	I
G	10	3,3	0,054	1	N

(\*) 1 - Reagente único; 2 - Reagente preparado por mistura de volume fixo; 3 - Reagente preparado com pipetagem. (\*\*) N - Nacional; I - Importada

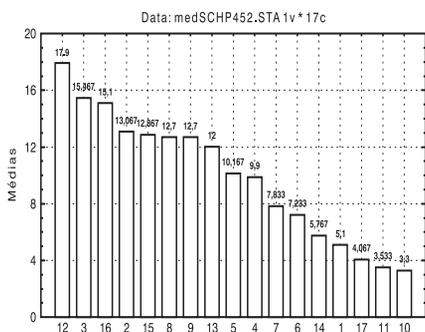


FIG. 4 - Distribuição das 17 marcas, segundo as médias do desvio do ideal, para o Soro Controle HS P 452.

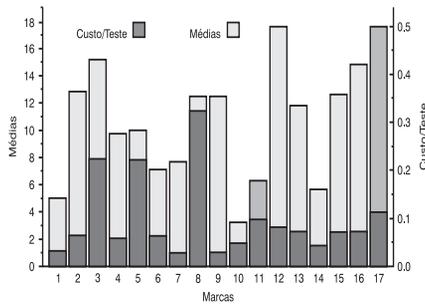


FIG. 5 - Comparação entre as médias do desvio do ideal e custo por teste, para as marcas estudadas, com o Soro Controle HS P 452.

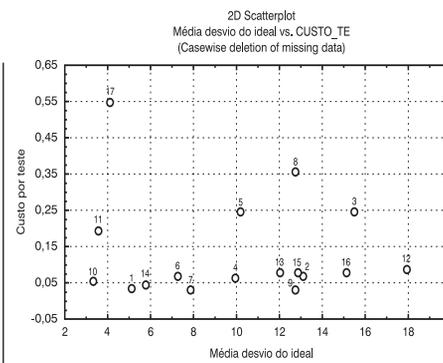


FIG. 6 - Relação custo por teste pela média do desvio do ideal para o Soro Controle HS P 452.

la constam ainda do custo por teste realizado, tipo de reagente e origem das marcas estudadas.

As medidas clínicas quantitativas deveriam ser altamente exatas e precisas, mas sabe-se que os métodos e técnicas em uso comum têm graus de incerteza e variabilidade (Statland *et al.*, 1995). Devido a estas variabilidades, com o uso de soros controles para monitorar os métodos, serão observadas diferenças entre marcas. O que se deseja é que essas diferenças não sejam significativas, a ponto de alterar ou interferir em um diagnóstico.

O presente estudo desejou demonstrar a variabilidade das diversas marcas quando sujeitas ao mesmo erro experimental, isto é, sob as mesmas condições de trabalho.

O valor da média do desvio do ideal quanto mais próximo de zero, é considerado o de melhor desempenho. A marca do estudo número 12 possui a maior média do desvio do ideal, com o soro controle HS P 452 de valor teórico de 183 mg/dl demonstrando um desempenho menor.

Diferenças de comportamento foram observadas ainda na análise gráfica das médias do desvio do ideal, na Figura 1. As marcas estudadas com maiores médias foram as de números 3, 12 e 16.

Com a observação da Figura 4 é possível verificar as diferenças de desempenho em ordem decrescente, para as médias do desvio do ideal, das 17 marcas quando realizadas as dosagens para colesterol na amostra.

O melhor desempenho para o soro controle HS P 452 foi a marca de número 10, enquanto que o pior desempenho foi o da marca número 12.

A análise do soro controle mais próximo do nível de decisão de 200mg/dl, demonstra ser mais eficiente

porque analisa o desempenho dos testes nesta faixa mais crítica, onde o nível do colesterol é o desejável, segundo o NCEP (2001).

Foi possível verificar a partir dos dados demonstrados anteriormente, nos grupos de A a G, que o menor (número 9) e o maior (número 8) custo das marcas realizadas no aparelho Cobas Mira<sup>®</sup> para o Soro Controle HS P 452 pertencem ao grupo C. O maior custo total foi o da marca número 17, realizada no equipamento Dade Dimension<sup>®</sup>, que pertence ao grupo G, isto pode ser melhor visualizado na Figura 5.

Na Figura 6, a distribuição do custo/teste pela média do desvio do ideal das marcas estudadas mostrou que não há uma relação direta entre o maior custo e melhor desempenho.

A marca de número 10, de origem nacional, é a que possui menor custo e melhor desempenho, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

O coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ) obtido para as médias do desvio do ideal e o custo por teste foi de  $r = -0,116$  com o valor de  $p = 0,656$ , aceita a hipótese nula ( $H_0$ ) da não correlação entre os dados.

O valor de  $r$  será tão mais próximo de 1 (ou -1) quanto mais forte for a correlação nos dados observados. Quando não houver correlação nos dados,  $r$  acusará um valor próximo de zero (Barbetta, 2001).

O valor de encontrado (0,656) demonstra não existir significância ao nível de 5%, isto é, não existe correlação positiva entre os dados.

Com a observação das Figuras 5 e 6, nota-se que há custo elevado com média baixa, assim como custo elevado e média alta. Por outro lado, médias baixas com custo baixo e também médias altas com custo baixo. Conclui-se que o desempenho das marcas não tem relação direta com seu custo pelos dados observados.

O ideal é conseguir uma marca que obtenha melhor desempenho, ou seja, menor valor de média do desvio do ideal, com um custo baixo. Na Figura 6 é possível verificar que as marcas que ocupam o quadrante esquerdo inferior são aquelas que possuem custo menor com desempenho melhor.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise realizada na amostra utilizada para analisar as 17 marcas de conjuntos para diagnóstico *in vitro* conclui-se que:

- As marcas de conjunto para diagnóstico *in vitro* para dosagem de colesterol não possuem desempenho igual, diferindo significativamente ao nível de 5% uma das outras.

- As marcas de conjunto para diagnóstico *in vitro*, com aplicação do teste de Duncan, formaram 7 agrupamentos que são significativamente diferentes ao nível de 5%, nas condições deste experimento.

- Não há uma relação positiva significativa em relação ao binômio custo e qualidade do desempenho das marcas de conjunto para diagnóstico *in vitro*, verificado pelo teste de significância  $p$  sobre o valor da correlação,  $r$ , como foi evidenciado na Figura 10.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Pedro A. Barbetta pelo incentivo e colaboração. À administração do LAC do HU UFSC e aos colegas do setor de Bioquímica.

## REFERÊNCIAS

1. Barbetta, Pedro Alberto. *Estatística aplicada às Ciências Sociais*. 4ª ed. Florianópolis: UFSC, 2001.
2. Bazzo, M. L. *Avaliação do uso de testes treponêmicos imunoenzimáticos competitivos na triagem sorológica da sífilis em 29.531 soros de uma população de baixa prevalência*. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 103f, 1999.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 686, 27 de agosto de 1998. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/686\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/686_98.htm)>. Acesso em: 16 maio 2001.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Comitê Gestor do Programa de Qualidade do Sangue do Ministério da Saúde (PQS/MS). *Projeto: implantação de programa de qualidade total na Hemorrede*. Brasília, 1999.
5. Johnson, R. N.; Baker, J. R. Analytical error of home glucose monitors: comparison of 18 systems. *Ann. Clin. Biochem.* London, n.36, p.72-79, 1999.
6. Juran, J. M. *Controle de qualidade. Métodos especiais de apoio à qualidade*. São Paulo: Makron do Brasil, 1993.
7. Keijzer, M. H. et al. Evaluation of five different high-density lipoprotein cholesterol assays: the most precise are not the most accurate. *Ann. Clin. Biochem.* London, n.36, p.168-175, 1999.
8. Koch, D. D.; Peters Jr, T. Selection and Evaluation of methods. In: *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p.320-324, 1999.
9. Mendonça, C. R. L. *Boas Práticas em Laboratório Clínico*. Teresópolis: Eventos de Teresópolis, 1998.
10. Miller, M. M. et al. Normal variation of plasma lipoproteins: postural effects on plasma concentrations of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Clinical Chemistry*, Washington DC, v.38, p.569-574, 1992.
11. Montgomery, D. C. *Design and analysis of experiments*. 4ª ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.
12. National Cholesterol Education Program - NCEP. Executive summary of 3rd report: expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). *JAMA*, Chicago, v.269, n.33, p.2486-2497, May 2001.
13. National Cholesterol Education Program - NCEP. Summary of 2nd report: expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult panel II). *JAMA*, Chicago, v.269, n.33, p.3015-3023, 1993.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. ISO/TC12. *Clinical laboratory testing an in vitro diagnostic test systems found in 1995*. NCCLS, 2000. Disponível em: <<http://www.nccls.org/default.htm>>. Acesso em: 18 de maio, 2001.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. 2ª edition. *NCCLS Document EP5-A*, v.19, n.2., Feb. 1999.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. User demonstration of performance for precision and accuracy; proposed guideline. *NCCLS Document EP15-P*, v.18, n.22, dec. 1998.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods. *NCCLS Document EP10-A*, v.18, n.6, 1998.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of matrix effects; proposed guideline. *NCCLS Document EP14-P*, v.18, n.2, 1998.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Uniformity of claims for *in vitro* diagnostics tests. *NCCLS Document EP11-P*, 1996.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method Comparison and Bias Estimation Using Patients Samples. *NCCLS Document EP9-A*, v.15, n.17, Dec. 1995.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of linearity of quantitative analytical methods. *NCCLS Document EP6-P*, v.6, n. 18, 1986.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry. *NCCLS Document EP7-P*, v.6, n.13, 1986.
23. Rajner, J. C. et al. A new approach for clinical biological assay comparison and standardization: application of principal component analysis to a multicenter study of twenty-one carcinoembryonic antigen immunoassays kits. *Clin. Chem.*, Washington DC, n.45, p.869-881, Jun. 1999.
24. Rifai, N.; Bachorik, O. S; Alberts, J. J. Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins. In: *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p.809-861, 1999.
25. Scholnik, W. *Acreditação de laboratórios clínicos*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2000.
26. Sociedade Brasileira de Cardiologia. II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemia. Detecção, avaliação e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Rio de Janeiro, v.67, n.2, ago. 1996.
27. Statsoft. ANOVA/MANOVA. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/stanman.html>>. Acesso em: 29 de mar. 2001.
28. Treitinger, A. et al. Avaliação de tiras reagentes utilizadas na análise de urina para os parâmetros: proteínas, glicose e hemácias. *Laes & Haes*, São Paulo, v.20, n.119, jun./jul. 1999.
29. Vieira, S.; Hoffmann, R. *Estatística Experimental*. São Paulo: Atlas, 1989.
30. Westgard, J. O.; Klee, G. G. Quality management. In: *Tietz textbook of Clinical Chemistry*, 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. p.384-391.
31. Westgard, J. O. *Automated chemistry applications*. Disponível em <<http://www.westgard.com/lesson58.htm>>. Acesso em 8 de jul. 2000.

Endereço para correspondência

Elizabeth Martins Hermes

Lab. de Anál. Clín. do Hosp. Univ. da UFSC - CP 5199 - Trindade

88.040-970 - Florianópolis, SC - E-mail: control@hu.ufsc.br

# Efeitos dos fitoestrógenos da soja e da terapia de reposição hormonal sobre a formação de $\cdot\text{NO}$ , homocisteína e óxidos de colesterol em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas\*

## Effect of soy phytoestrogens and hormonal replacement therapy on $\cdot\text{NO}$ , homocysteine and cholesterol oxides formation in postmenopausal hypercholesterolemic women

Isabela Rosier Olimpio Pereira<sup>1</sup>; André Arpad Faludi<sup>2</sup>; Marcelo Chiara Bertolami<sup>2</sup>; Maria Fernanda Campos<sup>3</sup>; Nadjara Novaes<sup>3</sup>; Simone Ferderbar<sup>3</sup>; José Mendes Aldrighi<sup>4</sup> & Dulcineia Saes Parra Abdalla<sup>3</sup>

**RESUMO** – Verificou-se o efeito dos fitoestrógenos da soja e da terapia de reposição hormonal sobre a concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), homocisteína e óxidos de colesterol (COx) em mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas que receberam placebo por um mês e posteriormente gérmen de soja (F, n=11), 17 $\beta$ -estradiol (E, n=12) ou 17 $\beta$ -estradiol associado ao acetato de noretisterona (E+P, n=11). Determinou-se os NOx e S-nitrosotióis por quimioluminescência em fase gasosa, a homocisteína por eletroforese capilar e os COx, por cromatografia gasosa. O gérmen de soja reduziu as concentrações de NOx ( $34 \pm 16$  para  $22 \pm 9 \mu\text{M}$ ,  $p=0,048$ ) e de homocisteína ( $13 \pm 4$  para  $9 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $p=0,036$ ) e aumentou a concentração de S-nitrosotióis ( $87 \pm 45$  para  $180 \pm 92 \text{ nM}$ ,  $p=0,007$ ), em relação ao placebo. Não foi encontrada diferença significativa para as terapias E e E+P sobre os NOx, homocisteína e S-nitrosotióis. A concentração de óxidos de colesterol foi reduzida nos grupos F e E ( $96,97 \pm 41,74$  para  $28,52 \pm 11,47 \text{ ng/uL}$ ,  $p=0,00002$  e  $88,7 \pm 56,9$  para  $33,9 \pm 15,8 \text{ ng/uL}$ ,  $p=0,027$ , respectivamente). O uso de fitoestrógenos do gérmen da soja reduziu a concentração de homocisteína, aumentou a concentração de S-nitrosotióis e, associada ao 17 $\beta$ -estradiol, reduziu a formação de COx. Portanto, estes dados indicam um efeito protetor dos fitoestrógenos em relação à disfunção endotelial e ao risco de aterosclerose na pós-menopausa.

**PALAVRAS-CHAVE** – Isoflavonas, estradiol, menopausa, óxido nítrico, óxidos de colesterol, homocisteína.

**SUMMARY** – The effect of phytoestrogens and hormone replacement therapy on nitric oxide metabolites (Nox), homocysteine and cholesterol oxides concentration was evaluated in hypercholesterolemic postmenopausal women that received placebo for 1 month followed by soy germ (F, n=11), 17 $\beta$ -estradiol (E, n=12) or 17 $\beta$ -estradiol plus noretisterone acetate (E+P, n=11) therapy for 1 month. NOx and S-nitrosothiols were analyzed by chemiluminescence in gaseous phase. Homocysteine was determined by capillary electrophoresis. COx were analysed by gas chromatography. Soy germ phytoestrogens reduced NOx ( $34 \pm 16$  to  $22 \pm 9 \mu\text{M}$ ,  $p=0.048$ ) and homocysteine ( $13 \pm 4$  to  $9 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $p=0.036$ ) concentrations and increased S-nitrosothiols concentration ( $87 \pm 45$  to  $180 \pm 92 \text{ nM}$ ,  $p=0.007$ ) in relation to placebo. No significant effects were found for E or E+P therapy on NOx, homocysteine and nitrosothiols concentrations. Cholesterol oxides concentrations were reduced in F and E groups ( $96.97 \pm 41.74$  to  $28.52 \pm 11.47 \text{ ng/uL}$ ,  $p=0.00002$  and  $88.7 \pm 56.9$  to  $33.9 \pm 15.8 \text{ ng/uL}$ ,  $p=0.027$ , respectively), but not in E+P group. Soy germ phytoestrogens reduced homocysteine and increased S-nitrosothiol concentrations. When associated with 17 $\beta$ -estradiol, phytoestrogens reduced cholesterol oxides levels. Thus, these data indicate a protective effect of phytoestrogens on endothelial dysfunction and the risk of atherosclerosis in postmenopause.

**KEYWORDS** – Isoflavones, estradiol, menopause, nitric oxide, cholesterol oxides, homocysteine.

### INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares são menos prevalentes em mulheres na pré-menopausa quando comparadas a mulheres pós-menopausa, ou, homens (Barret-Connor e Bush, 1991). Este efeito protetor é atribuído aos

estrógenos, sendo que um dos mecanismos de ação estaria relacionado ao metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (Walsh *et al.*, 1991). Os estrógenos reduzem o colesterol da LDL e aumentam o colesterol da HDL (Kannel *et al.*, 1976). Entretanto, estas mudanças no perfil lipídico contribuiriam apenas para cerca

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 15/7/2002

\*Prêmio DOLES - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo;

<sup>2</sup>Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; <sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Univ. de São Paulo;

<sup>4</sup>Departamento de Saúde Materno-Infantil - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo

de 25% do efeito protetor dos estrógenos (Stampfer *et al.*, 1991). Outros mecanismos potenciais de ação dos estrógenos incluiriam a proteção contra a oxidação da LDL (Sack *et al.*, 1994), a diminuição da lipoproteína (a), a potencialização da fibrinólise (Koh *et al.*, 1997) e o aumento da sensibilidade à insulina. Nas artérias, os estrógenos melhoram a função vasodilatadora, diminuem a calcificação e a secreção de moléculas de adesão celular (E-seletina, ICAM-1 e VCAM-1) e a formação de lesões ateroscleróticas (Koh *et al.*, 1999).

Ações diretas dos estrógenos sobre a parede arterial também têm sido demonstradas. A administração de estrógenos por períodos prolongados inibe a deposição arterial de colesterol e o espessamento da íntima, em macacos e coelhos alimentados com uma dieta aterogênica (Adams *et al.*, 1990). Entretanto, os mecanismos que determinam os efeitos diretos dos estrógenos na parede arterial ainda não estão completamente elucidados. Os efeitos hemodinâmicos podem ser mediados, em parte, pela atividade dos estrógenos sobre a síntese de óxido nítrico endotelial (Hishirikawa *et al.*, 1995). Tem sido sugerido que os estrógenos podem melhorar a função endotelial e diminuir os riscos de aterosclerose em mulheres pré-menopausa. O óxido nítrico tem sua bioatividade reduzida na mulher pós-menopausa; entretanto, não está claro se isto ocorre devido à sua menor produção pelo óxido nítrico sintase, ou, se o óxido nítrico é inativado pela reação com o radical superóxido, também gerado pelas células endoteliais, formando o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que é um forte agente oxidante. Diversos estudos indicam que a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio está associada à inativação do óxido nítrico pela formação de peroxinitrito (Dewitt *et al.*, 2001; Van der Loo *et al.*, 2000; Strunk *et al.*, 2001).

Pelo fato da exposição aos estrógenos induzir proliferação endometrial, aumentar levemente o risco de câncer de mama, de tromboembolismo e de doença da vesícula biliar, durante o uso prolongado (Satyaswaroop *et al.*, 1989), têm sido pesquisadas alternativas para a terapia de reposição hormonal. A descrição de um novo receptor estrogênico, ER- $\beta$  (Kuiper *et al.*, 1996), tem possibilitado a compreensão de efeitos seletivos de substâncias estruturalmente relacionadas ao estrógeno. Embora o exato papel fisiológico do ER- $\beta$  ainda esteja sob investigação, diferenças específicas na sua localização tecidual provêm explicações para diferentes efeitos de substâncias estrogênicas em vários tecidos. O ER- $\beta$  é expresso em diversos tecidos, tais como, o tecido ósseo e o sistema vascular (Kuiper *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1998).

Devido aos seus efeitos benéficos na aterosclerose e risco de câncer, as isoflavonas podem ser usadas como uma alternativa para a terapia de reposição hormonal. Isoflavonas são os fitoestrógenos mais importantes presentes em vegetais. As isoflavonas genisteína e daidzeína, derivadas da soja, se ligam a receptores estrogênicos, provavelmente por suas similaridades estruturais com estrógenos. De acordo com Kuiper *et al.* (1998), a afinidade da genisteína ao ER- $\beta$  é aproximadamente 20 vezes maior que ao ER- $\alpha$ . Comparado com o estradiol, a afinidade de ligação da genisteína e da daidzeína, respectivamente, ao ER- $\alpha$  foi de 4% e 0,1%, e para o ER- $\beta$  foi de 87% e 0,5% (Kuiper *et al.*, 1998). As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína, assim como suas formas glicosiladas, acetiladas e com-

plexadas aos resíduos malonil (genistina, daidzina e glicitina), formonetina e biocianina A são consideradas substâncias potencialmente antioxidantes (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997), inibidoras de crescimento tumoral (Wei *et al.*, 1993), da agregação plaquetária (Furman *et al.*, 1994) e da secreção de serotonina (Nakashima *et al.*, 1991). Vários estudos têm mostrado a ação vasodilatadora das isoflavonas da soja (Honoré *et al.*, 1997, Chin-Dusting *et al.*, 2001 e Mishra *et al.*, 2000).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito das isoflavonas da soja e da terapia de reposição hormonal sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico, por meio da determinação da concentração de seus derivados, ou seja, NOx (nitrito e nitrato) e S-nitrosotióis, sobre a concentração de homocisteína e a formação de óxidos de colesterol (produtos da peroxidação lipídica) no plasma de mulheres pós-menopausa hipercolesterolêmicas.

## MÉTODOS

### Pacientes e coleta

O projeto foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa das instituições envolvidas. Foram selecionadas 34 mulheres em fase de menopausa, pelo período mínimo de um ano, com idades entre 50 e 65 anos, que foram distribuídas randomicamente em 3 grupos de estudo duplo-cego. As mulheres tomaram o respectivo placebo pelo período de um mês, quando foi feita a primeira coleta de sangue (col 1) e, posteriormente, germen de soja (60 mg de isoflavonas/dia) (F, n=11), 17 $\beta$ -estradiol (2mg/dia) (E, n=12) ou 17 $\beta$ -estradiol (2 mg/dia) mais acetato de noretisterona (1mg/dia) (E+P, n=11) por 1 mês, quando foi feita a segunda coleta de sangue (col 2). O sangue foi coletado em jejum de 12 a 15 horas em tubos contendo EDTA e o plasma foi separado e armazenado em tubos contendo antioxidante (butil hidroxitolueno, BHT 20  $\mu$ M) e os inibidores de proteases aprotinina (2 $\mu$ g/ml), fenil-metil-sulfonil fluoreto, PMSF (1mM) e benzamidina (2 mM).

O germen de soja foi fornecido pela Herborisa (IsoSoy<sup>®</sup>) e o 17 beta-estradiol e sua associação com acetato de noretisterona foram fornecidos pela Medley<sup>®</sup>.

### Determinação de lipídeos

As determinações de colesterol plasmático total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais (BioSystems<sup>®</sup>).

### Determinação dos derivados de óxido nítrico (NOx) e S-nitrosotióis

A concentração de nitrito no plasma foi determinada pelo analisador de <sup>\*</sup>NO (NOA<sup>TM280</sup>, Sievers INC., USA). O plasma foi desproteínezado previamente em etanol gelado (1:2, v/v), deixado em repouso por 30 minutos a 0°C e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do sobrenadante foi injetada no analisador de <sup>\*</sup>NO (NOA<sup>TM280</sup>). A curva de calibração foi feita com padrões de nitrito de sódio. No NOA<sup>TM280</sup>, o nitrito plasmático é reduzido a <sup>\*</sup>NO com vanádio (III) a 90°C, e o <sup>\*</sup>NO formado é detectado por quimiluminescência em fase gasosa, após reação com ozônio.

A determinação de S-nitrosotióis totais foi feita de acordo com Marley *et al.*<sup>25</sup>, com modificações. Aliquotas de 500  $\mu$ L de plasma, previamente preparado, foram injetadas em duplicata na cela do analisador de  $^*NO$  (NOA<sup>TM280</sup>), contendo 16 mL de ácido acético glacial, 4 mL de KI 50 mg/mL, 1000  $\mu$ L de decanol (agente anti-espumante) e 400  $\mu$ L de  $CuSO_4$  200 mM (esta solução foi trocada para cada 8 injeções). A curva de calibração foi feita a partir de S-nitrosoalbumina, sintetizada de acordo com Marley *et al.*, 2001.

### Determinação de tióis

Os tióis foram determinados pela técnica de eletroforese capilar acoplada à detecção por fluorescência induzida a laser (HPE-LIF) de acordo com Vecchione *et al.* (1999), com modificações. O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. Em 200  $\mu$ L de plasma adicionou-se 2  $\mu$ L de padrão interno (1 mM n-(2-mercaptopropionil)-glicine) e 20  $\mu$ L de tri-n-butilfosfina 10% (v/v em dimetilformamida). Homogeneizou-se a preparação e incubou-se por 30 minutos a 4°C. A seguir, adicionou-se 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10% contendo 1mM de EDTA dissódico. Homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se as amostras a 13000 x g por 5 minutos a 4°C. A 100  $\mu$ L do sobrenadante, acrescentou-se 100  $\mu$ L de tampão fosfato 0,5M e ajustou-se o pH para 7,5 com  $Na_3PO_4$  1M. O derivatizador (5-bromometilfluoresceína) foi adicionado às amostras em um excesso molar de 5 a 10 vezes, incubando-se as preparações por 15 minutos a 60°C. Após a derivatização, diluiu-se as amostras 1/10 (20  $\mu$ L do derivatizado em 180  $\mu$ L de tampão fosfato 0,25 M pH 7,6), injetando-as com uma pressão de 0,5 psi por 1,5 segundo em um capilar de 67 cm, 75  $\mu$ m de diâmetro interno. A corrida eletroforética foi realizada a 25°C, em 30 kV e polaridade positiva na injeção. O detector de fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 520 nm (emissão). A cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 1M.

### Determinação dos óxidos de colesterol

A fração lipídica do plasma (1000  $\mu$ L) foi extraída com clorofórmio:metanol (1:2 v/v), contendo 50 $\mu$ L de 5 $\alpha$ -colestano (Steraloids, Inc) (500 ng/ $\mu$ L) como padrão interno. O extrato lipídico foi evaporado sob corrente de nitrogênio e o resíduo foi redissolvido em 1,0 ml tolueno:acetato de etila (1:1, v/v). A fração lipídica neutra (triglicerídeos, colesterol e óxidos de colesterol) e a fração lipídica polar (fosfolípidos) foram iso-

ladas por eluição seqüencial através de uma coluna para extração em fase sólida (Waters Diol columns) com tolueno:acetato de etila, seguido por metanol. A fração lipídica neutra foi submetida à saponificação alcalina e metilação com diazometano etéreo. As amostras foram derivatizadas a trimetilsilil (TMS), utilizando-se 50 uL de dimetil-formamida e 50 uL de N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA, Sigma) (1:1, v/v). Os tubos foram selados, purgados com nitrogênio, aquecidos a 80°C por 20 min e então transferidos para um frasco. Uma alíquota de 1 $\mu$ L foi injetada no cromatógrafo à gás (CG 6890-Plus – Hewlett Packard), acoplado a uma coluna HP-5 (30 m de comprimento, 0,32mm D.I., 0,25  $\mu$ m de espessura do preenchimento; Hewlett Packard) e operada com "split ratio" de 1:5. Utilizou-se hidrogênio como gás carreador a um fluxo de 5 ml/min. A temperatura de injeção foi de 290°C e a temperatura inicial da coluna igual a 260°C. A corrida foi programada para permanecer à temperatura inicial por 2 min seguida por uma rampa de 5°C/min até 290°C. A temperatura do detector de ionização de chama foi de 300°C. Os padrões usados foram (Steraloids, Inc.): 5-cholestene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol (7 $\alpha$ -OH), 5-cholestene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol (7 $\beta$ -OH), cholestan-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -epox), cholestan-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -epox), cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT), 5-cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one (7-Keto) e 5-cholesten-3 $\beta$ ,25-diol (25-OH). O 7-keto e o 25-OH apresentam o mesmo tempo de retenção e foram quantificados como uma somatória, usando-se como padrão uma solução de concentração equimolar de cada um deles.

### Determinação de estradiol

A determinação da concentração de estradiol foi realizada utilizando-se o "kit" IMx<sup>®</sup> System Estradiol da Abbott Laboratories.

### Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o método "one way" ANOVA e o programa ORIGIN 5.0. As correlações foram feitas pelo método de Pearson utilizando-se o programa Sigma Stat 1.0. O nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

As Figuras 1, 2 e 3 mostram a concentração de colesterol do plasma, da LDL e da HDL, respectivamente, nas coletas 1 e 2. Somente o grupo E+P teve as

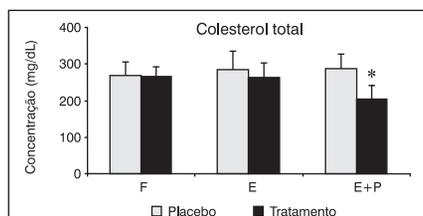


FIG. 1 – Comparação da concentração de colesterol total encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17 $\beta$ -estradiol (E) ou 17 $\beta$ -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

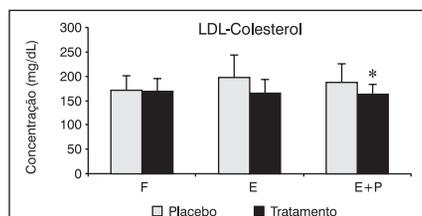


FIG. 2 – Comparação da concentração de LDL-colesterol encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17 $\beta$ -estradiol (E) ou 17 $\beta$ -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

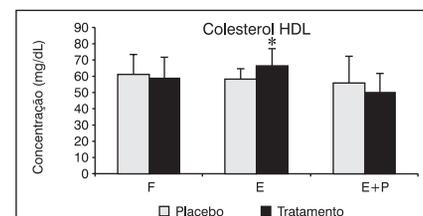


FIG. 3 – Comparação da concentração de HDL-colesterol encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17 $\beta$ -estradiol (E) ou 17 $\beta$ -estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

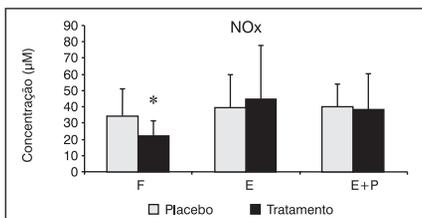


FIG. 4 – Comparação da concentração de NOx encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

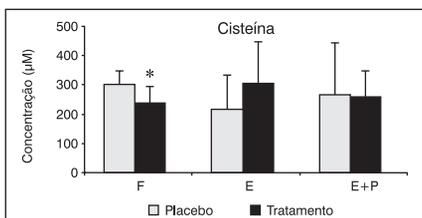


FIG. 7 – Comparação da concentração de Cisteína encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

concentrações de colesterol total e LDL-colesterol reduzidas significativamente em relação o uso de placebo. Somente o grupo E teve um aumento da concentração de HDL-colesterol após o tratamento.

As Figuras 4 e 5 mostram a concentração plasmática de NOx e S-nitrosotóis, respectivamente, dos três grupos analisados. O grupo suplementado com fitoestrógenos teve uma redução da concentração plasmática de NOx e um aumento da concentração de nitrosotóis em relação ao uso de placebo.

As Figuras 6 e 7 mostram que as concentrações de homocisteína e cisteína foram reduzidas no grupo suplementado com isoflavonas. A concentração de metionina não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 8).

As Figuras de 9 a 11 mostram as concentrações de óxidos de colesterol. Os grupos F e E tiveram redução significativa da concentração de óxidos de colesterol totais após o período de tratamento (Figura 9). Não houve alteração das concentrações de 7-alfa-hidroxicolesterol e colestanoetriol em nenhum dos grupos analisados (Figuras 10 e 11), embora os grupos E e E+P tenham mostrado uma certa tendência de redução. Os óxidos 7-beta-hidroxicolesterol e beta-epoxicolesterol foram reduzidos apenas no grupo F. Houve uma tendência de redução do alfa-epoxicolesterol em todos os tratamentos, embora no grupo E não tenha sido significativa (Figura 13).

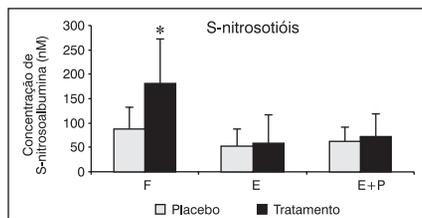


FIG. 5 – Comparação da concentração de S-nitrosoalbumina encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

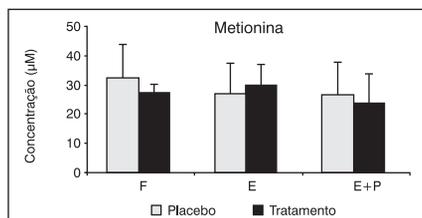


FIG. 8 – Comparação da concentração de Metionina encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

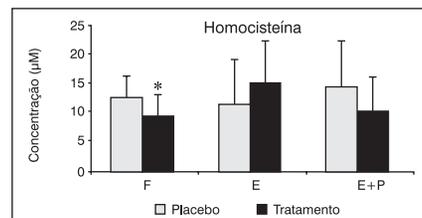


FIG. 6 – Comparação da concentração de Homocisteína encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

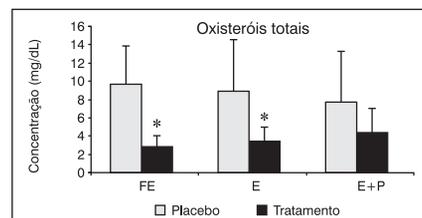


FIG. 9 – Comparação da concentração de oxisteróis totais encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

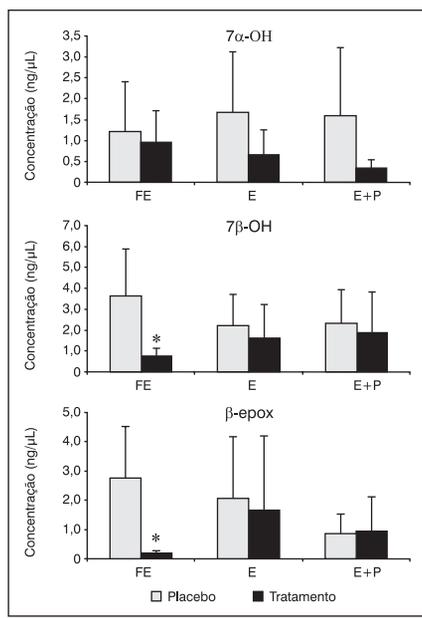


FIG. 10 – Comparação da concentração de 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e β-epoxicolesterol encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

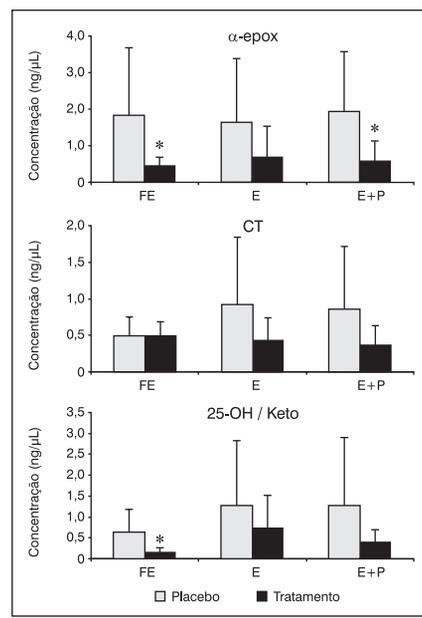


FIG. 11 – Comparação da concentração de α-epoxicolesterol, colestanoetriol, e 26-hidroxicolesterol/7 cetocolesterol encontrada após o uso de placebo e após uso de fitoestrógenos (F), 17β-estradiol (E) ou 17β-estradiol + acetato de noretisterona (E+P). Os valores são apresentados como média ± desvio-padrão. \*Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, as concentrações de 25-OH-colesterol e 7-cetocolesterol foram reduzidas significativamente apenas no grupo F.

A Tabela I mostra algumas correlações importantes encontradas neste trabalho. A concentração de estradiol correlacionou-se negativamente com a do LDL-colesterol e negativamente com a do HDL-colesterol. A concentração de homocisteína correlacionou-se po-

**TABELA I**  
**Correlação entre as concentrações plasmáticas**  
**de vários parâmetros analisados ( $r^2$  /  $p < 0,05$ )**

Correlação $r^2$ / $p$	LDL-colesterol	HDL-colesterol	Cisteína	Metionina	S-nitrosotióis
Estradiol	-0,58/<0,001	0,54/0,003	0,52/0,01	-	-
Homocisteína	-	-	0,70/<0,0001	0,32/0,02	-0,27/0,043
Cisteína	-	-	-	-	-0,28/0,034

sitivamente com as concentrações de metionina e cisteína e, negativamente, com a concentração de S-nitrosotióis. As concentrações de cisteína se correlacionaram negativamente com os níveis de S-nitrosotiol e positivamente as concentrações de estradiol.

## DISCUSSÃO

Após a terapia de reposição hormonal simples ou combinada, observou-se uma tendência de redução do LDL-colesterol, embora apenas a terapia combinada tenha mostrado diferença estatística (Figura 2). A associação do acetato de noretisterona ao 17 $\beta$ -estradiol anulou o efeito da terapia simples em aumentar o HDL-colesterol (Figura 3). Os estrógenos aumentam o fluxo de colesterol da dieta para o fígado, por meio da sua incorporação aos quilomícrons e posterior captação hepática dos remanescentes de quilomícrons. Subseqüentemente, ocorre o fluxo de colesterol para as células do tecido periférico, pelas VLDL e LDL, e o retorno ao fígado pelo transporte reverso do colesterol, via HDL. O colesterol, nas células hepáticas, é transformado em ácidos biliares, que por sua vez são excretados na bile. Sob a influência dos estrógenos, ocorrem os seguintes eventos:

(i) os triglicerídeos plasmáticos aumentam devido ao aumento da produção de VLDL;

(ii) a concentração de LDL é reduzida, devido ao aumento da expressão do receptor da LDL;

(iii) a HDL é aumentada por dois mecanismos: maior secreção de apolipoproteína A-1 e decréscimo da lipólise, pois os estrógenos levam à redução da atividade da lipase hepática (revisado por Zhu *et al.*, 1999).

Os progestágenos são usados juntamente com os estrógenos na reposição hormonal pós-menopausa para balancear o efeito proliferativo dos estrógenos no endométrio; entretanto, alguns progestágenos têm atenuado os benefícios cardiovasculares do estrógeno. Progestágenos parecem reduzir o efeito estimulatório do estrógeno sobre o transporte das lipoproteínas na circulação sanguínea. Especificamente, promovem uma redução da secreção de VLDL, da remoção de remanescentes da VLDL, da atividade do receptor da LDL, o que resulta no aumento do colesterol da LDL, e diminuição da HDL, associada com um aumento da atividade da lipase hepática (Zhu *et al.*, 1999).

As isoflavonas presentes no germen de soja não modificaram o perfil lipídico em um mês de tratamento. Alguns trabalhos têm demonstrado redução de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol após tratamento com isoflavonas de soja (Antony *et al.*, 1996 e Crouse *et al.*, 1999). Outros trabalhos não têm visto alterações no perfil lipídico com o uso de isoflavonas (Greaves *et al.*, 1999 e Nestel *et al.*, 1997). Esse efeito pode ser dependente do tempo de tratamento, das diferenças na composição de isoflavonas nos produtos e das doses utilizadas.

A condição de hipercolesterolemia está associada a um aumento da concentração plasmática de nitrato (Pereira, 2000 e Freyschuss *et al.*, 1996). Recentemente, a localização da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em invaginações especializadas da membrana plasmática, denominadas cavéolas, tem sido proposta como necessária para a máxima atividade dessa enzima (Forsterman *et al.*, 1991; Boje *et al.*, 1990). As cavéolas são altamente enriquecidas em colesterol. O RNA mensageiro da caveolina (proteína presente nas cavéolas e que interagem com eNOS) é hiper-regulado quando a entrada de colesterol livre da LDL para a célula é aumentada e a regulação do efluxo de colesterol livre pela via caveolar é modulada pela caveolina (Fielding *et al.*, 1997). Várias evidências indicam que o aumento da regulação da caveolina, em células expostas a altos níveis de LDL-colesterol, resulta diretamente de um aumento na transcrição do gene da eNOS, induzido pelo maior conteúdo celular de colesterol (Bist *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* demonstram que, após 24 horas de exposição das células endoteliais a baixas concentrações de LDL oxidada (LDL-ox), observa-se aumento do RNA mensageiro da eNOS, porém em altas concentrações de LDL-ox, esse efeito é revertido (Hirata *et al.*, 1995). Além disso, a hipercolesterolemia pode promover a produção de óxido nítrico pela NOS indutível (Wan *et al.*, 2000). Essas observações mostram que existe correlação entre a produção de óxido nítrico, a hipercolesterolemia e a peroxidação lipídica.

Barbacanne *et al.* (1999) encontraram aumento da atividade do NO, induzido pelos estrógenos, mas não observaram mudanças na expressão do gene da eNOS, ou da atividade dessa enzima, embora detectassem menor produção do radical superóxido. A diminuição da geração de superóxido derivado do endotélio, em resposta aos estrógenos, poderia aumentar a bioatividade do óxido nítrico por diminuir a sua inativação pela formação de peroxinitrito. Hayashi *et al.* (1999) verificaram que o 17  $\beta$ -estradiol aumenta a atividade da eNOS, mediada por receptor, sendo que altas concentrações de 17  $\beta$ -estradiol tenderam a inibir a atividade da eNOS por uma via independente de receptor. Observou-se, ainda, que o 17  $\beta$ -estradiol diminuiu a liberação de óxidos de nitrogênio (NOx) produzidos pela óxido nítrico sintase indutível (iNOS), em cultura de macrófagos. Muitas condições patológicas, incluindo isquemia/reperfusão, inflamação e a deficiência de tetrahydrobiopterina, um cofator para a síntese de óxido nítrico, podem induzir a produção simultânea de radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e  $^{\cdot}NO$  em diversos tecidos (Lancaster *et al.*, 1996), gerando peroxinitrito (Huie *et al.*, 1999), que possui potencial oxidante bem maior que o dos radicais óxido nítrico ( $^{\cdot}NO$ ) e superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) isoladamente. O peroxinitrito promove a nitração (incorporação de um grupo nitro -  $NO_2$ ) de resíduos alifáticos e aromáticos. Resíduos de tirosina nas proteínas constituem alvos-chave da nitração, mediada por peroxinitrito, sendo que a presença de 3-nitrotirosina em proteínas representa um marcador da formação endógena de peroxinitrito. Portanto, a redução da concentração de nitrato na hipercolesterolemia pode ser benéfica, significando uma reversão do estresse oxidativo envolvido no aumento de sua produção.

A administração das isoflavonas reduziu significativamente a concentração plasmática de nitrato. As iso-

flavonas, em especial a genisteína, inibem a síntese de óxido nítrico por inibição das proteínas tirosina quinases (Sargeant *et al.*, 1993, Orliceck *et al.*, 1996). Resultado semelhante foi encontrado após suplementação de coelhos machos hipercolesterolêmicos com isoflavonas da soja (Pereira, 2000), indicando que esse efeito pode ser independente do efeito estrogênico das isoflavonas.

Apesar de reduzir a concentração plasmática de nitrato, as isoflavonas da soja aumentaram a concentração de S-nitrosotióis. Isso demonstra que o óxido nítrico estaria mais biodisponível para formação de S-nitrosotióis, ao invés de ser degradado rapidamente. Os nitrosotióis (RSNO's) podem ser formados pela reação do  $\cdot\text{NO}$  com grupos tióis (Marley *et al.*, 2001) (presentes em resíduos de cisteína, homocisteína e glutatona) e a sua concentração é dependente da síntese de  $\cdot\text{NO}$  (Eiserich *et al.*, 1998). Os RSNO's possuem ação vasodilatadora e de inibição da agregação plaquetária (Eiserich *et al.*, 1998). Estes compostos são considerados como reservatórios de  $\cdot\text{NO}$  e muitos dos efeitos promovidos pelos RSNO's podem ser explicados pela liberação de  $\cdot\text{NO}$ . Entretanto, nem todos os efeitos biológicos descritos para os RSNO's são atribuídos à função doadora de  $\cdot\text{NO}$  desses compostos. Há evidências de um efeito intrínscio dos RSNO's devido à ativação da guanilato ciclase, produzindo vasodilatação (Stamler *et al.*, 1995). A alteração da atividade de vasodilatadora na pós-menopausa pode resultar da degradação acelerada do  $\cdot\text{NO}$  e/ou da sua menor conversão a RSNO's.

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, cujo metabolismo está situado entre duas vias metabólicas: remetilação e transulfuração. Na remetilação, a homocisteína adquire um grupo metil da N-5-metil-tetrahidrofolato (MTHF) ou de betaína para formar a metionina. A reação com MTHF acontece em todos os tecidos e é dependente de vitamina B<sub>12</sub>, enquanto que a de betaína ocorre principalmente no fígado e rins, em humanos. Na via de transulfuração a homocisteína se condensa com serina para formar a cistationa por meio de uma reação irreversível, dependente de piridoxal 5 fosfato (vitamina B<sub>6</sub>), formando ao final a cisteína (Bostom & Lathrop, 1997). A reatividade do grupo sulfidríla da homocisteína tem sido vista como um dos mecanismos envolvidos na ação da homocisteína na aterosclerose. A lesão vascular induzida pela homocisteína parece ser secundária à formação de peróxido de hidrogênio, proveniente da oxidação de aminoácidos sulfurados por agentes oxidantes, tais como o cobre (Starkebaum e Harlan, 1986). A formação de S-nitroso-homocisteína previne a oxidação do grupo tiol e a formação de peróxido de hidrogênio, além de ter potente ação vasodilatadora e de inibição da agregação plaquetária (Stamler *et al.*, 1993).

A exposição das células endoteliais à homocisteína por períodos longos (>3h) diminui a liberação de  $\cdot\text{NO}$ , enquanto que a exposição aguda (<15 min) induz um aumento na liberação de  $\cdot\text{NO}$ . A explicação para esse fato é que no primeiro momento ocorre a formação de S-NO-homocisteína. Paralelamente, ocorre a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que degrada a S-NO-homocisteína, gerando a tiolactona da homocisteína, produto tóxico para o endotélio (Stamler *et al.*, 1993). A degradação da S-NO-homocisteína também resulta na formação de nitrato.

Alguns estudos demonstram que após seis meses de terapia de reposição hormonal, ocorre uma redu-

ção da concentração de homocisteína (Man *et al.*, 2001; Hak *et al.*, 2001). Em contraste, os resultados mostrados neste trabalho não indicaram uma redução de homocisteína pelas terapias de reposição hormonal utilizadas. No entanto, no grupo tratado com as isoflavonas, observou-se uma redução da concentração plasmática de homocisteína. Esse efeito está relacionado, provavelmente, ao aumento da formação e estabilização da S-nitroso-homocisteína. Isso é confirmado pela correlação negativa existente entre a concentração de S-nitrosotióis e homocisteína mostrada na Tabela I.

A inativação do óxido nítrico e a conseqüente formação de peroxinitrito pode promover a produção de várias espécies oxidantes (Beckman *et al.*, 1992). A molécula do colesterol também pode ser oxidada com a conseqüente formação dos óxidos de colesterol (oxisteróis). O colesterol oxidado na posição 7 pode reduzir o relaxamento dependente do endotélio e a produção de óxido nítrico por células endoteliais (Dekert *et al.*, 1997). Os óxidos de colesterol são encontrados em concentrações elevadas nas artérias ateroscleróticas e em lipoproteínas de pacientes hipercolesterolêmicos (Vaya *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que alguns óxidos de colesterol, principalmente o 7-cetocolesterol, possuem atividade anti-estrogênica (Murphy *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1989).

Dentre os óxidos de colesterol analisados, apenas o  $\alpha$ -epoxicolesterol apresentou redução significativa após tratamento com a terapia de reposição hormonal combinada, embora tenha havido uma tendência de redução da maioria dos oxisteróis com todas as tratamentos utilizados. Este óxido não inibe a síntese do óxido nítrico e não tem ação sobre receptores estrogênicos, mas possui ação citotóxica sobre as células endoteliais (Lizard *et al.*, 1997; Sevanian *et al.*, 1995). Porém, analisando-se a somatória de todos os oxisteróis, apenas os fitoestrógenos e o 17 $\beta$ -estradiol foram capazes de reduzir a concentração dos oxisteróis. As isoflavonas se mostraram mais eficientes que as TRH na redução dos óxidos de colesterol, pois, além dos efeitos estrogênico e antioxidante, nesse trabalho foi mostrada uma seqüência de efeitos que pode ter potencializado a sua ação na redução do estresse oxidativo e, conseqüentemente, na formação de oxisteróis, em relação à TRH. Alguns estudos verificaram que os progestágenos podem inibir o efeito antioxidante dos estrógenos (Zhu *et al.*, 2000; McManus *et al.*, 1997), justificando a perda da capacidade de redução dos óxidos de colesterol do grupo E+P. Estudos *in vitro* demonstram que o estradiol é mais efetivo que o  $\alpha$ -tocoferol ou o beta-caroteno em inibir a formação de óxidos de colesterol (Ayres *et al.*, 1996) sendo que vários estudos têm mostrado a ação antioxidante dos estrógenos *in vitro* (Zhu *et al.*, 1999) e *in vivo* (Brussard *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 1997; McKidney *et al.*, 1997).

A redução da inativação do óxido nítrico pela formação de peroxinitrito, o conseqüente aumento da formação de S-nitrosotióis e a redução da concentração de homocisteína pelas isoflavonas da soja são fatores que poderiam melhorar a vasodilatação e prevenir a formação de lesões ateroscleróticas na mulher pós-menopausa. Esses resultados parecem ser mediados pela inibição das proteínas tirosina-quinases e não pelo efeito estrogênico já que o mesmo efeito não pôde ser observado com a terapia de reposição hormonal convencional, durante o período analisado. A redução da

concentração de óxidos de colesterol pelas isoflavonas de soja pode ser, em parte, consequência dos resultados de redução do estresse oxidativo envolvido na decomposição do óxido nítrico, além dos efeitos estrogênico e antioxidante, desde que um resultado menos intenso foi observado com o uso de 17 $\beta$ -estradiol. Estes resultados abrem novas perspectivas para futuras pesquisas em relação à eficiência do uso de fitoestrógenos como uma alternativa de reposição hormonal sobre a função endotelial e a prevenção da aterosclerose em mulheres pós-menopausa.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao PRONEX, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Adams M. R.; Kaplan, J. R.; Manuck, S. B.; Koritnik, D. R.; Parks, M. S.; Wolf, M. S.; Clarkson, T. B. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17- $\beta$ -estradiol in ovariectomized monkeys. *Arteriosclerosis*. 10:1051-7. 1990.
- Anthony, M. S.; Clarkson, T. B.; Huges, C. L.; Morgan, T. M.; Burke, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr. Bethesda*. v.126, p.43-50. 1996.
- Ayres, S.; Tang, M.; Subbiah, M. T. Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J. Lab. Clin. Med.* 128:367-75. 1996.
- Barbacanne, M. A.; Rami, J.; Michel J. B.; Soucharad, J. P.; Philippe, M.; Besombes, J. P.; Bayard, F.; Arnal, J. F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium derived superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.* 41:21-32. 1999.
- Barret-Connor, E.; Bush, T. I. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*. 265:1861-7. 1991.
- Beckman, J. S.; Ye, Y. Z.; Anderson, P. G.; Chen, J.; Accavitti, M. A.; Tarpey, M. M.; White, C. R. Extensive nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:438-44. 1992.
- Bist, A.; Fielding, P. E.; Fielding, C. J. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:10693-8. 1997.
- Boje, K. M.; Fung, H. L. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:20-6. 1990.
- Bostom, A. G.; Lathrop, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.* 52(1):10-20. 1997.
- Brussard, H. E.; Leuven, J. A. G.; Kluff, C. et al. Effect of 17 beta-estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal woman with type II Diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:324-339. 1997.
- Chin-Dusting, J. P.; Fisher, L. J.; Lewis, T. V.; Piekarska, A.; Nestel, P. J.; Husband, A. The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *Br. J. Pharmacol.* 133(4):595-605. 2001.
- Crouse, J. R.; Morgan, T. M.; Terry, J. G.; Ellis, J.; Vitolins, M.; Burke, G. L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.* Chicago. v.159, p.2070-2076. 1999.
- Dekert, V.; Persegol, L.; Viens, L.; Lizard, G.; Athias, A.; Lallemand, C.; Gabert, P.; Lagrost, L. Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins. Cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation*. 95:723-31. 1997.
- Dewitt, D. S.; Mathew, B. P.; Chaisson, J. M.; Prough, D. S. Peroxynitrite reduces vasodilatory responses to reduced intravascular pressure, calcitonin gene-related peptide, and cromakalim in isolated middle cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:253-61. 2001.
- Eiserich, J. P.; Patel, R. P.; O'Donnell, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects Med.* 19:221-357. 1998.
- Enmark, E.; Gustafsson, J. A. Estrogen receptor beta-anovel receptor opens up new possibilities for cancer diagnosis and treatment. *Endocr. Related Cancer*. 5:213-222. 1998.
- Fielding, C. J.; Bist, A.; Fielding, P. E. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:3753-8. 1997.
- Forstermann, U.; Pollock, J. S.; Schmidt, H. H.; Heller, M.; Murad, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:1788-92. 1991.

- Freyschuss, A.; Xiu, R. J.; Benthin, G.; Henriksson, P.; Björkheim, I.; Wennmalm, A. Dietary cholesterol induces transient changes in plasma nitrate levels in rabbits that are correlated to microcirculatory changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Orlando. v.221, p.107-110. 1996.
- Furman, M. I.; Grigoryev, D.; Bray, P. F.; Dise, K. R.; Goldschmidt-Clermont, P. J. Platelet tyrosine kinases and fibrinogen receptor activation. *Circ. Res.* 75(1):172-180. 1994.
- Greaves, K. A.; Parks, J. S.; Williams, J. K.; Wagner, J. D. Intract dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized *Cynomolgus* monkeys. *J. Nutr. Bethesda*. v.129, p.1585-1592. 1999.
- Hak, A. E.; Bak, A. A. A.; Lindermans, J.; Planellas, J.; Bennink, H. J. T. C.; Hofman, A.; Grobbee, D. E.; Witteman, J. C. M. The effect of hormone replacement therapy on serum homocysteine levels in perimenopausal women: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis*. 158(2):437-443. 2001.
- Hayashi, T.; Yamada, K.; Esaki, T.; Kano, H.; Asai, Y.; Kumar Thakur, N.; Jayachandran, M.; Sumi, D.; Iguchi, A. Endothelium-dependent relaxation of rabbit atherosclerotic aorta was not restored by control of hyperlipidemia: the possible role of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). *Atherosclerosis*. 147:349-63. 1999.
- Hirata, K.; Miki, N.; Kuroda, Y.; Sakoda, T.; Kawashima, S.; Yokoyama, M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 76:958-62. 1995.
- Hishikawa, K.; Nakaki, T.; Marumo, H.; Suzuki, H.; Kato, R.; Saruta, T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 360:291-3. 1995.
- Honoré, E. K.; Williams, J. K.; Antony, M. S.; Clarkon, T. B. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertility and Sterility*. 67:148-54. 1997.
- Huie, R. E.; Padjama, S. The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals. *Free Radical Res. Commun.* 18:195-199. 1993.
- Hwang, P. L.; Matin, A. Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *J. Lipid Res.* 30:239-245. 1989.
- Kannel, W. B.; Hjorthland, M. C.; McNamara, P. M.; Gordon, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: The Framingham study. *Ann. Intern. Med.* 85:447-52. 1976.
- Koh, K. K.; Mineemoyer R.; Bui, M. N.; Casco, G.; Pucino F.; Guetta V.; Waclawiw, M.; Cannon, R. O. III. Effect of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 336:683-90. 1997.
- Koh, K. K.; Blum, A.; Hathaway, L.; Mineemoyer, R.; Csako, G.; Waclawin, M. A.; Panza, J. A.; Cannon, R. O. III. Vascular effects of estrogen and vitamin E therapies in postmenopausal women. *Circulation*. 100:1851-7. 1999.
- Kuiper, G. G.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B.; Corton, J. C.; Safe, S. H.; Van Der Saag, P. T.; Van Der Burg, B.; Gustafsson, J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139:4252-4263. 1998.
- Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Cloning of anovel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:5925-5930. 1996.
- Lancaster, J. J. R. *Nitric oxide: principles and actions*. Academic Press, Inc. 1996.
- Lizard, G.; Gueldry, S.; Deckert, V.; Gamber, P.; Lagrost, L. Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects. *Pathol. Biol.* 45:281-90. 1997.
- Man, R. Y. K.; Ting, L. K. F.; Fan, S.; Lau, M. M. H.; Siow, Y. L.; Chung, Y. H.; O, K. Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on lipoprotein and homocysteine levels in chinese women. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 225:(1-2) 129-134. 2001.
- Marley, R.; Patel, R. P.; Ori, N.; Ceaser, E.; Darley-Usmar, V.; Moore, K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 31:688-96. 2001.
- Mckidney, K. A.; DUELL, P. B.; WHEATON, D. L. et al. Differential effects of subcutaneous estrogen and progesterone on low-density lipoprotein size and susceptibility to oxidation in postmenopausal rhesus monkeys. *Fertil. Steril.* 68:525-530. 1997.
- Mcmanus, J. M.; ENENY, J. M.; THOMPSON, W.; YOUNG, I. S. The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low-density lipoprotein in postmenopausal woman. *Atherosclerosis*. 135:73-81. 1997.
- Mcmanus, J. M.; Eneny, J. M.; Thompson, W.; Young, I. S. The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low-density lipoprotein in postmenopausal woman. *Atherosclerosis*. 135:73-81. 1997.
- Mishra, S. K.; Abbot, S. E.; Choudhury, Z.; Cheng, M.; Khatab, N.; Maycock, N. J.; Zavery, A.; Aaronson, P. L. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc. Res.* 46(3):539-46. 2000.
- Murphy, P. R.; Breckenridge, W. C.; Lazier, C. B. Binding of oxygenated cholesterol metabolites to antiestrogen binding sites from chicken liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:786-92. 1985.
- Myers, P. R.; Minor, R. L. J.; Guerra, R. J.; Bates, J. N.; Harrison, D. G. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*. 345:161-3. 1990.
- Nakashima, S.; Koike, T.; Nozawa, Y. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A2-mediated human platelet responses. *Mol. Pharmacol.* 39(4):475-480. 1991.
- Nestel, P. J.; Yamashita, T.; Sasahara, T.; Pomeroy, S.; Dart, A.; Komesaroff, P.; Owen, A.; Abbey, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in meopausal and perimenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Baltimore. v.17, p.3392-3398. 1997.
- Orlicek, S. L.; Meals, E.; English, B. K. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on tumor necrosis factor and nitric oxide production by murine macrophages. *J. Infect. Dis.* Chicago. v.174, n.3, p.638-642. 1996.

47. **Pereira, I. R. O.** *Influência das isoflavonas da soja na produção de proteínas de choque térmico e óxido nítrico na aterosclerose experimental induzida pela dieta*. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
48. **Ruiz-Larrea, M. B.; Mohan, A. R.; Paganga, G.; Miller, N. J.; Bolwell, G. P. and Rice-Evans, C. A.** Antioxidante activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad. Res.* 26:63-70. 1997.
49. **Sack, M. N.; Rader, R. J.; Cannon, R. O. III.** Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal woman. *Lancet.* 343:269-70. 1994.
50. **Sargeant, P.; Farndale, R. W.; Sage, S. O.** ADP- and thapsigargin-evoked  $Ca^{2+}$  entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in Fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.* Bethesda. v.268, n.24, p.18151-18156. 1993.
51. **Satyaswaroop, P. G.; Zaino, R. J.; Mortel, R.** Carcinoma of the endometrium and hormonal receptors. *Cancer Treat. Res.* 49:71-92. 1989.
52. **Sevanian, A.; Hodis, H. N.; Hwang, J.; Mcleod, L. L.; Peterson, H.** Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J. Lipid. Res.* 36:1971-86. 1995.
53. **Stamler, J. S.; Osborne, J. A.; Jaraki, O.; Rabbani, L. E.; Mullins, M.; Singel, D.; Loscalzo, J.** Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.* 91(1):308-18. 1993.
54. **Stamler, J. S.** S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 196:19-36. 1995.
55. **Stampfer, M. J.; Colditz, B. A.** Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: A quantitative assessment of epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20:47-63. 1991.
56. **Starkebaum, G.; Harlan, J. M.** Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 77(4):1370-6. 1986.
57. **Strunk, V.; Hahnenkamp, K.; Schneuing, M.; Fischer, L. G.; Rich, G. F.** Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth. Analg.* 92:681-7. 2001.
58. **Van Der Loo, B.; Labugger, R.; Skepper, J. N.; Bachschmid, M.; Kilo, J.; Powell, J. M.; Palacios-Callender, M.; Erusalimsky, J. D.; Quaschnig, T.; Malinski, T.; Gygi, D.; Ullrich, V.; Luscher, T. F.** Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 192:1731-44. 2000.
59. **Vaya, J.; Aviram, M.; Mahmood, S.; Hayek, T.; Grenadir, E.; Hoffman, A.; Milo, S.** Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic. Res.* 34:485-97. 2001.
60. **Vecchione, G.; Margaglione, M.; Grandone, E.; Colaizzo, D.; Cappucci, G.; Fermo, I.; D'angelo, A.; Di Minno, G.** Determining sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis: a fast novel method for total homocyst(e)ine human plasma. *Electrophoresis.* 20(3):569-74. 1999.
61. **Walsh, B. W.; Shiff, I.; Rosner B.; Breenberg, L.; Ravnika V.; Sacks, F. M.** Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N. Engl. J. Med.* 325:1196-204. 1991.
62. **Wan, G.; Ohnami, S.; Kato, N.** Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(3):555-61. 2000.
63. **Wei, H.; Wei, L.; Frenkel, K.; Bowen, R.; Barnes, S.** Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer.* 20(1):1-12. 1993.
64. **Zhu, X.; Bonet, B.; Gillenwater, H.; Knopp, R. H.** Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:214-21. 1999.
65. **Zhu, X. D.; Bonet, B.; Knopp, R. H.** Estradiol 17 $\beta$  inhibition of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity is opposed by progestins to different degrees. *Atherosclerosis.* 148:31-41. 2000.

Endereço para correspondência:  
 Dulcineia Saes Parra Abdalla  
 Laboratório de Bioquímica Clínica  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - BI 17 superior  
 Cidade Universitária - São Paulo, SP - 05508-900  
 E-mail: dspa@usp.br

## Uma iniciativa com desempenho ainda mais confiável: planilhas e avaliações “on line”

### Demonstração de qualidade e respeito às necessidades dos clientes

O PNCQ - Programa Nacional de Controle de Qualidade é o melhor e maior Provedor de Ensaio de Proficiência da América Latina, assim como, o mais ágil na elaboração dos relatórios de avaliação. Essa avaliação, hoje, em até 15 dias, passará a ser disponibilizada em três dias, após o início da remessa “on line” dos resultados em janeiro próximo.

A SBAC - Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, portanto, continua na vanguarda da modernização tecnológica através do PNCQ, o único programa de Controle Externo da Qualidade no País com a certificação ISO.

O Ensaio de Proficiência, segundo informações da ANVISA, passará a ser obrigatório para os Laboratórios Clínicos, a partir de 2003.

*Entre no mundo da qualidade para demonstrar  
 a sua capacidade técnica e desempenho operativo.*

# Carga viral de HPV de alto risco por captura híbrida e lesões intra-epiteliais escamosas cervicais

## High risk HPV viral load by hybrid capture and cervical intraepithelial lesions

José Eleutério Junior<sup>1</sup>; Diane Isabelle Magno Cavalcante<sup>2</sup>; Fabrícia Martins Teixeira<sup>3</sup> & Renata Mirian Nunes Eleutério<sup>4</sup>

**RESUMO** – Estudos da carga viral de Papilomavírus humano (HPV) em relação a grau de lesões intra-epiteliais escamosas têm sido realizados, mas os resultados foram conflitantes. O objetivo deste trabalho foi correlacionar lesões intra-epiteliais escamosas cervicais (SIL), morfológicamente diagnosticadas como de baixo grau e alto grau e casos negativos para SIL no histopatológico, com carga viral de HPV de alto risco, obtida por captura híbrida de segunda geração. As cargas virais entre as três situações não demonstraram diferença estatisticamente significativa (SIL de baixo grau  $262 \pm 124,4$  RLU, SIL de alto grau  $631,2 \pm 287,2$  RLU, e negativo para SIL  $532,6 \pm 353,1$  RLU) ( $p > 0,05$ ). Assim, a carga viral de HPV de alto risco parece não ter correlação com o grau da lesão cervical, embora a persistência do HPV de alto risco com alta carga viral esteja relacionada com a recorrência e a evolução da lesão.

**PALAVRAS-CHAVE** – Papillomavírus humano, captura híbrida, lesão intra-epitelial escamosa.

**SUMMARY** – The high risk Human Papillomavirus (HPV) load has been evaluated in comparison with the grade of cervical intra-epithelial lesions, but the results have been conflicting. The aim of this study was to correlate cervical squamous intra-epithelial lesions (SIL), morphologically diagnosed as low grade and high grade, and cases negative for SIL on tissue, with viral load of high risk HPV by hybrid capture of second generation. The viral loads in the three situations showed no statistical significant difference (low grade SIL  $262 \pm 124.4$  RLU, high grade SIL  $631.2 \pm 287.2$  RLU, and negative for SIL  $532.6 \pm 353.1$  RLU) ( $p > 0.05$ ). So, the high risk HPV load seems to have no correlation with the cervical lesion grade, even though the high risk HPV persistence with high viral load is related to recurrence and evolution of the cervical lesions.

**KEYWORDS** – Human papillomavirus, hybrid capture, squamous intra-epithelial lesion.

### INTRODUÇÃO

Uma correlação entre lesões escamosas cervicais, cancerosas e pré-cancerosas e o Papilomavírus humano (HPV) está bem estabelecida e parece claro que HPV de alto risco está presente em virtualmente todos os cânceres cervicais<sup>4,5,7,8,9,10</sup>. Sabe-se que as lesões intra-epiteliais escamosas têm, inclusive, um maior potencial evolutivo quando há grupo de HPV de alto risco de forma persistente<sup>1,2,3,4,5,6,8,9,10</sup>, com substancial evidência epidemiológica e laboratorial de um papel central desta persistência viral na etiologia do câncer cervical e seu precusores<sup>8</sup>.

Trabalhos recentes têm abordado a questão da carga viral como fator de risco para lesões escamosas cervicais de alto grau<sup>1,2,3,5,4,8,9,10</sup>, considerando que mulheres de alto risco seriam identificadas pelo uso de um teste quantitativo de HPV em adição a citologia de rastreamento<sup>10</sup>. A taxa de positividade e a carga viral de DNA-HPV de alto risco, aumentariam com a severidade de lesões escamosas cervicais<sup>9</sup>. Com o uso de PCR, método extremamente sensível na detecção de DNA-HPV, tem-se mostrado que a maioria das mulheres com SIL de baixo grau tem baixa carga viral, ao passo que, mulheres com HSIL teriam uma maior quantidade do DNA-HPV. O teste de captura híbrida de segunda geração (CH II), que tem mostrado ter sensibilidade e especificidade semelhantes ao do PCR, quantifica a carga viral do grupo identificado<sup>1,2,3</sup>. Através da CH II para HPV a análise da quantidade de DNA do grupo viral poderia, assim, prever o risco de câncer<sup>4</sup>.

No entanto, outros autores consideram que a persistência viral, mas não a carga viral, representa ferramen-

ta confiável para selecionar populações de risco para desenvolvimento de lesões de alto grau<sup>3</sup>. Embora pareça a alguns que a quantidade de DNA-HPV poderia ser um indicador para severidade e história natural de doença cervical, mais estudos são necessários para avaliar o significado da carga viral na progressão neoplásica, visto os resultados discrepantes relatados até o momento<sup>3,8,9</sup>.

Nosso objetivo é avaliar comparativamente a carga de DNA-vírus de alto risco (grupo B, do método de CH II) em casos de HPV latente (sem lesão morfológica), lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL), com diagnósticos colposcopicamente e histologicamente confirmados.

### MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 2001 a janeiro de 2002, foram biopsiadas e submetidas à pesquisa de Papilomavírus humano (HPV) de maneira concomitante, 85 pacientes submetidas à colposcopia, em que se evidenciava zona de transformação anormal.

O material de biópsia foi fixado em formol a 10% e encaminhado ao laboratório de patologia, onde foi processado para coloração em hematoxilina e eosina.

A identificação de DNA-HPV em escovado cervical, colhido imediatamente antes da colposcopia, foi determinado por captura híbrida de 2ª geração. O material colhido do colo, na zona suspeita, foi desnaturado e hibridizado para detecção por quimioluminescência e leitura em microplaca, de dois grupos virais, grupos A (6, 11, 42, 43, 44) e B (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). A expressão foi medida como unidade de luz reativa (RLU).

Recebido em 22/7/2002

Aprovado em 12/8/2002

<sup>1</sup>Professor Assistente Orientador – Universidade Federal do Ceará (UFC); <sup>2</sup>Patologista – Laboratório Prof. Eleutério da Costa (LABPEC);

<sup>3</sup>Bolsista SIPIBIC-UFC; <sup>4</sup>Bolsista LABPEC

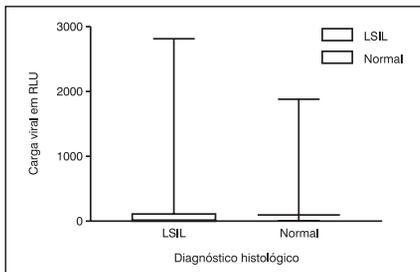


FIG. 1 - Correlação da carga viral de grupo HPV de alto risco (B) entre casos de LSIL (n=26) e casos com biópsia negativa (normal) (n=5)

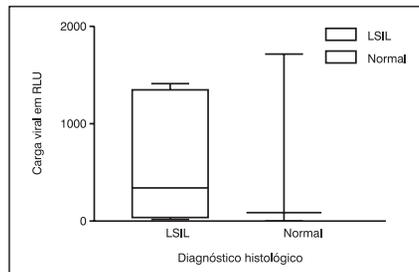


FIG. 2 - Correlação da carga viral de grupo HPV de alto risco (B) entre casos de HSIL (n=6) e casos com biópsia negativa (normal) (n=5)

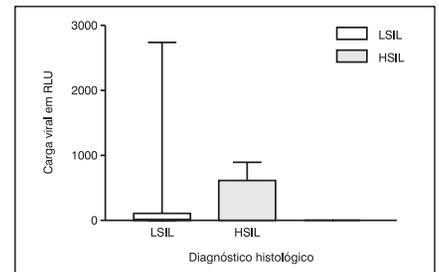


FIG. 3 - Correlação da carga viral de grupo HPV de alto risco (B) entre casos de LSIL (n=26) e casos de HSIL (n=6)

Foram considerados positivos casos maiores ou iguais a 1 RLU, conforme orientação do fabricante.

A correlação entre a carga viral de casos positivos para o grupo B (37) foi feito com 26 casos de HPV/NIC I (lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau), 6 casos de NIC II/NIC III (lesão intra-epitelial escamosa de alto grau) e 5 casos sem anormalidade na biópsia.

Utilizou-se teste *t* de Student, para avaliação não paramétrica dos grupos, através do programa Prism 3.0, com intervalo de confiança de 95% e considerando com estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

O projeto do estudo foi submetido a comitê de ética e aprovado.

## RESULTADOS

Dos 85 casos estudados a CH II foi positiva em 50 oportunidades (58,82%), das quais em 37 (74%) havia positividade para o grupo B.

Naqueles diagnosticados como LSIL pela biópsia e com CH II positivo para grupo B, a carga viral variou de 1,23 a 2814,9 RLU, com uma média de 262 ( $\pm 124,4$ ). Quando o diagnóstico histopatológico foi de HSIL a carga viral mínima encontrada foi de 63,07 e a máxima de 1549,11 RLU, com uma média de 631,2 ( $\pm 287,2$ ). Já no grupo de quadro latente, ou seja, sem lesão identificada na biópsia guiada por colposcopia, a carga viral variou de 2,79 a 1882,21 RLU, com uma média de 532,6 ( $\pm 353,1$ ).

Ao se comparar o grupo de LSIL com o grupo de latência viral observa-se que não há diferença significativa ( $p = 4064$ ) entre as cargas virais de casos clínicos e sub-clínicos, com lesão identificada de baixo grau, e casos latentes, com ausência de lesão morfológica (Figura 1). Quando a avaliação é feita entre os grupos de HSIL e latente, o valor de *p* demonstra também não haver diferença estatística significativa ( $p = 0,8314$ ) (Figura 2). O mesmo ocorre na comparação de grupos de LSIL e HSIL onde a carga viral mais alta não se correlacionou com a gravidade da lesão ( $p = 0,2169$ ) (Figura 3).

## DISCUSSÃO

Alguns estudos têm mostrado uma maior quantidade de DNA-HPV em material de colo com lesão de alto grau do que quando há lesão de baixo grau. Utilizam-se, assim, este dado como indicador de condutas mais agressivas, mesmo quando o diagnóstico morfológico é menor<sup>3,9</sup>. A presença de vírus de alto risco de forma predominante entre lesões de alto grau e câncer têm sido bastante discutida como falho fator de prognóstico, uma vez que conforme nossa própria observação, mesmo em lesões de baixo grau, a incidência de HPV de alto risco é alta<sup>1,2,6</sup>.

Embora a carga viral venha sendo defendida como importante fator diagnóstico e prognóstico entre alguns autores. Nossos dados nos impelem a concordar com Clavel *et al.*<sup>3</sup> que não dão tanta importância a carga viral, mas sim a persistência do vírus. Conforme nos foi possível observar, mesmo no grupo de mulheres com infecção

latente foi encontrado um caso com carga viral de 1882,21 RLU, considerada extremamente alta. Os grupos de LSIL e HSIL tiveram a maior carga viral de 2814,9 RLU e 1549,11 RLU, respectivamente. O estudo dos grupos avaliados não mostrou diferença estatisticamente significativa entre LSIL e HSIL ( $p = 0,2169$ ), HSIL e latente ( $p = 0,8314$ ) e entre LSIL e latente ( $p = 0,4064$ ). No trabalho referido<sup>3</sup>, os autores ponderaram que a carga viral de DNA-HPV de alto risco não pode ser considerada um teste sensível para ser usado na prática diária com finalidade de predição da persistência do vírus e rastreamento de lesões de alto grau.

Dessa forma, pelos achados do presente estudo não podemos considerar que a questão da carga viral esteja definida. Embora as lesões de alto grau tenham grupo de DNA-HPV de alto risco, a sua carga viral é semelhante às lesões de baixo grau e até a quadros de latência, o que pode levar a um sobre-tratamento quando do uso da carga viral para delinear condutas diagnósticas. Cremos que antes da carga viral a conduta deve ser delineada pela morfologia e pela identificação de persistência viral, diagnosticada pelo teste do HPV, principalmente após o tratamento. Concordando com Clavel *et al.*<sup>3</sup>, consideramos uma indicação para o uso da captura híbrida, o seguimento de mulheres tratadas para lesões cervicais no intuito de identificar as com persistência viral e, neste caso, com alta carga viral, que seriam consideradas de risco para recidivas e evolução.

## REFERÊNCIAS

1. Appgar B. S.; Brotzman, G. HPV testing in the evaluation of the minimally abnormal Papanicolaou smear. *Am. Fam. Physic.* 59:2794-800, 1999.
2. Bergeron, C. *et al.* Human Papillomavirus testing in women with mild cytologic atypia. *Obstet. Gynecol.* 2000;95:821-7.
3. Clavel, C. *et al.* Human Papillomavirus detection by the hybrid capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn. Mol. Pathol.* 9:145-50, 2000.
4. Josefsson *et al.* Viral load of human Papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet.* 355:2189-93, 2000.
5. Lee, N. W. *et al.* Is the human Papillomavirus test in combination with the Papanicolaou test useful for management of patients with diagnoses of atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125:1453-7, 2001.
6. Lin, C. T. *et al.* High risk HPV DNA detection by hybrid capture II. An adjunctive test for mildly abnormal cytologic smears in women > 50 years of age. *The J. Reprod. Med.* 45:345-50, 2000.
7. Peitsaro, P.; Johansson, B.; Syrjänen, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 40:886-91, 2002.
8. Sun, C. A. *et al.* The significance of human Papillomavirus load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 83:95-9, 2001.
9. Sun, C. A. *et al.* Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 76:41-7, 2002.
10. Ylitalo, N. *et al.* Consistent high viral load of human Papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet.* 355:2194-8, 2000.

Endereço para correspondência

José Eleutério Junior

Rua Tenente Benévolo, 1560 / 202 - Aldeota

CEP 60160-041 - Fortaleza - Ceará - E-mail: eleuterio@secrel.com.br

# Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro

## Schoolchildren intestinal parasitosis prevalence in Seropédica, Rio de Janeiro

Marcelo Silva Marinho<sup>1</sup>; Grazielle Brito da Silva<sup>1</sup>; Carla Andresa Diele<sup>2</sup> & João Bezerra de Carvalho<sup>3</sup>

**RESUMO** – As helmintoses intestinais representam um grave problema de saúde pública. No Brasil, esse problema se agrava, devido à falta de saneamento básico associado à falta de medidas pessoais de higiene. O presente trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica. Neste estudo foram avaliadas 1092 amostras de fezes de crianças com idade entre 3 e 15 anos, no período de setembro de 1995 a maio de 2001. As amostras coletadas foram examinadas pela técnica de Kato, como descrita por Katz *et al.* (1972). O percentual de amostras positivas foi de 33,88% e a de negativas, 76,12%. Os resultados mostram a ocorrência de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma sp.*, *Hymenolepis nana* e *Enterobius vermicularis*.

**PALAVRAS-CHAVE** – Prevalência, enteroparasitoses, escolares, Seropédica.

**SUMMARY** – The enteric helminth represents a serious problem in the public health. In Brazil this problem aggravate it self because of the non having basic sanitation associated to the absence of personal hygienics customs. The present work has the objective to verify the prevalent of enteric parasitics in the public schools students of Seropédica. In this study was appraised 1092 children samples who was an age between 3 and 15 years old, since September of 1995 to may of 2001. the samples collected was examined by the Kato tecnic, like's was report by Katz *et al.* (1972). The positive results percentage was 33.88% and the negative, 76.12%. This results shows the occurrence of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma sp.*, *Hymenolepis nana* and *Enterobius vermicularis*.

**KEYWORDS** – Prevalent, enteric helminth, school students, Seropédica.

## INTRODUÇÃO

As helmintoses intestinais representam um grave problema de saúde pública, principalmente, nos países de terceiro mundo, onde se verificam condições precárias de saneamento básico e higiene. A alta frequência de enteroparasitoses pode gerar déficits orgânicos, com comprometimento no desenvolvimento normal das crianças. Nos adultos, pode haver uma limitação na capacidade de produção, gerando em suas formas mais graves, grande número de enfermos, que pesam nos orçamentos familiares e no Estado, pela improdutividade ou pelos custos de assistência médica e hospitalar<sup>8</sup>. A transmissão desses parasitos, geralmente é oro-fecal, ou seja, a infecção dá-se pela ingestão de ovos ou cistos, através de alimentos, água ou mesmo de qualquer outro objeto contaminado com fezes, que se coloque na boca. Há alguns anos, foram realizados trabalhos isolados, mostrando altos índices de prevalência de enteroparasitoses chegando a atingir mais de 50% da população estudada<sup>4,6,7</sup>. Os helmintos mais encontrados em crianças em idade escolar são *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*<sup>3</sup>. No estado do Rio de Janeiro, alguns trabalhos têm demonstrado a alta prevalência de enteroparasitoses, princi-

palmente em crianças, devido ao contato mais estreito com as formas infectantes e a sua imunidade ainda ser deficiente para eliminação destes parasitos<sup>3</sup>. Este trabalho teve como objetivo, verificar a prevalência de enteroparasitoses de escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de setembro de 1995 a maio de 2001 foram analisadas 1092 amostras fecais de escolares da rede pública de Seropédica, na faixa etária entre 3 e 15 anos, de ambos os sexos.

Foram entregues aos responsáveis ou aos próprios alunos potes contendo solução conservadora (90% de água destilada, 5% de mercúrio cromo e 5% de formol). No momento da entrega, os alunos foram instruídos quanto à coleta do material.

O procedimento utilizado para o exame parasitológico das fezes foi a técnica de Kato, como descrito por Katz *et al*<sup>5</sup>. Os resultados dos exames foram entregues aos interessados, sendo os casos positivos encaminhados ao posto médico. Ao fim do trabalho, foram realizadas palestras nas escolas, esclarecendo as medidas preventivas para se evitar essas parasitoses.

Recebido em 26/7/2002

Aprovado em 10/8/2002

<sup>1</sup>Graduandos em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ);

<sup>2</sup>Mestranda em Clínica Médica Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ;

<sup>3</sup>Professor Adjunto IV, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

## RESULTADOS

A prevalência de enteroparasitoses encontrada nas 1092 amostras foi de 370 amostras positivas, correspondendo a 33,88%, sendo estes valores próximos aos encontrados por outros autores. O parasita de maior prevalência foi *A. lumbricoides*, com uma frequência total de 79,46%, seguido de *T. trichiura* com 38,92% (do total de exames positivos). A Tabela 1 mostra a prevalência de parasitos em crianças do sexo masculino e feminino.

O poliparasitismo intestinal, ou seja, a presença simultânea de duas ou mais espécies de parasitos atingiu 76 indivíduos (20,54% dos indivíduos parasitados). A Tabela II apresenta a prevalência dos parasitos em escolares da rede pública de Seropédica.

**TABELA I**  
Frequência de enteroparasitos em 1092 escolares, segundo o sexo, no período de setembro de 1995 a maio de 2001, em Seropédica, RJ

Sexo	Negativo	Positivo	Total	Frequência (%)
Masculino	339	175	514	34,05
Feminino	383	195	578	33,74

**TABELA II**  
Prevalência de enteroparasitos em exames positivos realizados em escolares da rede pública, no município de Seropédica, RJ, no período de set. de 1995 a maio de 2001

Parasitos	Total	Frequência (%)
<i>Ancylostoma</i> sp.	2	0,54
<i>Ascaris lumbricoides</i>	219	59,19
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0,27
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0,27
<i>Trichiuris trichiura</i>	71	19,19
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	70	18,92
<i>A. lumbricoides</i> + <i>Ancylostoma</i> sp.	2	0,54
<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. vermicularis</i>	1	0,27
<i>T. trichiura</i> + <i>E. vermicularis</i>	1	0,27
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>E. vermicularis</i>	1	0,27
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>H. nana</i> + <i>Ancylostoma</i> sp.	1	0,27
<b>Total</b>	<b>370</b>	<b>100,00</b>

## DISCUSSÃO

O elevado índice de parasitoses encontrado no presente trabalho é um reflexo da falta de saneamento básico da região estudada, bem como, o baixo nível

sócio econômico e a falta de medidas pessoais de higiene da população em geral.

O índice de infecção parasitária encontrado foi igual a 33,88% das amostras.

Os resultados obtidos evidenciaram as prevalências mais elevadas para *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, ambas espécies com contaminação oral-fecal. Os ancilostomídeos apresentaram baixos índices. Estes resultados podem estar subestimados devido aos casos de leve infecção, propiciando diagnósticos falsos negativos<sup>1</sup>.

Este trabalho foi realizado em escolares, por acreditarmos que este é o local mais propício para educação da saúde, pelo grande número de crianças, que nesta fase de vida, podem adquirir com mais facilidade hábitos e atitudes.

A quimioterapia nos casos positivos foi realizada na tentativa de controlar as parasitoses intestinais. Porém, sabemos que a mesma não é o bastante para a erradicação das helmintoses, mas que ela deve estar associada a medidas de melhoramento ambiental e elevação do nível educacional<sup>2</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Booth, M.; Bundy, D. Comparative prevalence of *Ascaris lumbricoides*, *Tricuris trichiura* and hookworms infection and the prospect for combined control. *Parasitology*, 105:151-157, 1992.
2. Camillo-Coura, L. Contribuição à profilaxia das geohelmintoses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, VIII(6):341-356, 1974.
3. Costa-Macedo, L. M.; Silva, J. R. M.; Silva, R. R.; Oliveira, L. M.; Vianna, M. S. R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidade favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pùb.*, 14:851-855, 1998.
4. Ferreira, C. S.; Ferreira, M. U.; Nogueira, M. R. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana (São Paulo, SP). *Cad. Saúde Pùb.*, 7:82-89, 1991.
5. Katz, N.; Chaves, A.; Pellegrino, J. Simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 14:397-402, 1972.
6. Nunes, M. P. O.; Nunes, J. F. L.; Silva, E. M. A.; Costa, M. S. G. Ocorrência de parasitoses intestinais em crianças da creche "Lar Menino Jesus", Natal - RN. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 29(3):195-196, 1997.
7. Oliveira, M. F.; Costa, S. T. C. B. C.; Bezerra, F. S. M. Incidência de enteroparasitos na zona rural do município de Parnaíba, Piauí. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 33(1):45-48, 2001.
8. Rey, L. *Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1991, 349 p.

Endereço para correspondência

Marcelo Silva Marinho

Instituto de Veterinária, Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

BR 465, Km 7, 23890-000, Seropédica, RJ

E-mail: marcelorural@yahoo.com.br

## CURSOS

### Especialização em Ciências do Laboratório Clínico Especialização em Citologia Clínica

Pós-graduação *Lato sensu*

#### Coordenação

Paulo Murillo Neufeld  
Faculdade de Farmácia da UFRJ

#### Informações

Tel. (0xx21)2562-6405/6421

### XV Curso de Especialização em Virologia

Pós-graduação *Lato sensu*

#### Coordenação

Profª Maria Genoveva von Hubinger  
Prof. José Nelson dos S. S. Couceiro

#### Local

Depto. de Virologia  
Inst. de Microbiologia Prof. Paulo de Góes  
UFRJ - Rio de Janeiro/RJ  
E-mail: jncouceiro@micro.ufrj.br

# Sepse relacionada ao uso de cateter intravascular\*

## Intravascular catheter - related sepsis

T. B. Filippin<sup>1,2</sup>; F. B. Nunes<sup>2</sup>; T. A. Castaman<sup>2</sup>; R. C. V. Santos<sup>2</sup>; J. C. F. Alves Filho<sup>2</sup> & J. R. Oliveira<sup>2</sup>

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi relacionar de forma retrospectiva, o uso de cateteres intravasculares em pacientes hospitalizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), com a incidência de bacteremia e sepsis. Os cateteres (n = 250) foram semeados em ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro. A cultura foi semi-quantitativa e, considerada positiva, quando encontrou-se o crescimento de 15 ou mais colônias em placa de agar. As hemoculturas foram incubadas e monitoradas pelo sistema Bact Alert (Organon Teknika). A identificação microbiana foi realizada através de provas bioquímicas convencionais ou sistemas automatizados. Do total de 250 cateteres, 12,4% tiveram cultura positiva (31/250), com maior frequência para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa (49%). Foram realizadas hemoculturas de 13 pacientes que tiveram cultura positiva para o cateter intracath, sendo que 7 (58,8%) foram positivas e, 4 dessas hemoculturas, apresentaram o mesmo microorganismo encontrado no cateter, sinalizando uma bacteremia devida ao cateter (30,7%). Dos 7 pacientes, 4 (57%) evoluíram clinicamente para sepsis e chegaram ao óbito. Esse achado, demonstra uma relação importante entre a implantação de cateteres intravasculares e o desenvolvimento de bacteremia e sepsis.

**PALAVRAS-CHAVE** – Sepsis, cateter, bacteremia.

**SUMMARY** – The aim of this paper was to analyze a retrospective way from the use of catheters in patients hospitalized in Intensive Care Units, with bacteraemia incidence and sepsis. The catheters (n=250) were sowed in agar blood (5% of sheep blood). The culture was semi-quantitative and considered positive, when were found the growth 15 or more colonies in agar plate. The hemocultures were incubated and monitored by the Bact Alert system (Organon Teknika). The microbial identification was accomplished through conventional biochemical proofs or automated systems. From the 250 catheters, 12.4% had positive culture (31/250) in which the most frequent were the *Staphylococcus* sp. negative coagulase (49%). Also it was accomplished the hemocultures of 13 patient who had positive culture for the catheter intracath, 7 (58.8%) were positive and 4 of those hemocultures presented the same microorganism found in the catheter, meaning a due bacteraemia to the catheter (30.7%). From 7 patients, 4 (57%) developed clinically for sepsis and died. That results demonstrates an important relationship between the intravascular catheter implantation and the bacteraemia development and sepsis.

**KEYWORDS** – Sepsis, catheter, bacteraemia.

## INTRODUÇÃO

Vários fatores predis põem os pacientes ao desenvolvimento de sepsis como: medicina invasiva (cateteres, monitorização, diagnóstico), terapias imunossupressoras (câncer e transplante), aumento da longevidade (particularmente de pacientes com doenças crônicas (como diabetes e câncer), incidência aumentada de infecção por germes multirresistentes e aumento da população de pacientes com doenças imunossupressoras (AIDS)<sup>3</sup>.

A presença de infecção associada com o uso de cateter venoso central é uma das mais freqüentes causas de morbidade e mortalidade, representando uma fonte de bacteremia e sepsis em pacientes hospitalizados<sup>6</sup>.

Os critérios clínicos existentes não são suficientes para estabelecer o diagnóstico de infecção relacionada ao cateter. O diagnóstico usualmente empregado, requer remoção da ponta de cateter para realização de cultura. A limitação para esse diagnóstico é que o estudo é geralmente realizado de forma retrospectiva e, so-

mente 15 a 25% dos cateteres removidos por suspeita de infecção, estão realmente infectados. Para evitar a remoção injustificada do cateter e os riscos associados a introdução de um novo dispositivo intravascular em outro sítio, outras técnicas como hemoculturas de amostras colhidas simultaneamente do cateter e de veia periférica, tem sido propostas. Apesar da alta especificidade deste método, este não é usado na rotina da prática clínica, devido a complexidade e custos elevados<sup>2</sup>.

A sepsis que é uma resposta inflamatória sistêmica a uma infecção, pode estar relacionada com a implantação e o tempo de permanência do cateter<sup>1,4</sup>. Os pacientes podem apresentar febre ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia, taquicardia e taquipnéia, acidose metabólica, trombocitopenia, choque, vasodilatação periférica e alteração renal e hepática, que resultam da passagem de microrganismos para o sangue<sup>15,16</sup>. O diagnóstico de sepsis e bacteremia induzida por cateter, pode ser baseado no isolamento simultâneo do mesmo microorganismo de culturas de cateter e sangue periférico<sup>5</sup>.

Recebido em 8/8/2002

Aprovado em 23/8/2002

\*Trabalho Desenvolvido no Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>1</sup>Laboratório Central da ISCMPA; <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Biofísica da PUCRS.

O presente trabalho caracteriza-se por um estudo retrospectivo, cujo objetivo foi relacionar o uso de cateter intravascular em pacientes hospitalizados em UTIs com a presença de bacteremia e sepse.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo consistiu em uma análise retrospectiva de 250 amostras de cateteres provenientes das UTIs que integram a Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre ISCMPA enviadas ao Laboratório Central no período de junho a agosto de 2001. De acordo com o Departamento de Epidemiologia do Hospital Henri Mondor – França, as hemoculturas incluídas no estudo foram somente aquelas colhidas 48 horas antes ou após à remoção do cateter.

As culturas realizaram-se no setor de bacteriologia do Laboratório Central de Análises Clínicas da ISCMPA. Os cateteres foram semeados em ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro (ágar sangue). A cultura realizada foi semi-quantitativa e foi considerada positiva quando encontrou-se o crescimento de 15 (quinze) ou mais colônias em placa de ágar sangue<sup>6</sup>. As hemoculturas, solicitadas em triplicata, foram incubadas e monitoradas pelo sistema automatizado Bact Alert, Organon teknika. A identificação microbiana foi realizada através de provas bioquímicas convencionais ou através de sistemas automatizados (MicroScan, DADE e Vitek, bioMeriéux).

Foram revisados os dados de prontuários dos pacientes que tiveram cultura de cateter positiva, que incluíam o tipo de cateter utilizado e seu tempo de permanência.

## RESULTADOS

Do total de 250 cateteres analisados, 31 apresentaram cultura positiva, correspondendo a 12,4% do total. O cateter que teve a maior ocorrência de positividade foi o Intracath, representando 42% dos 31 cateteres. A Figura 1 representa o percentual de positividade dos diferentes tipos de cateter. Os microrganismos encontrados nos cateteres e sua frequência podem ser identificados pela Figura 2.

Dos 31 cateteres positivos, em 13 amostras foram realizadas hemoculturas. Do total de hemoculturas, 7 amostras mostraram-se positivas, perfazendo 53,8%. Nestas 7 amostras positivas foram isolados os microrganismos *Staphylococcus sp. coagulase negativo*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii* e *Micrococcus sp*, cuja ocorrência pode-se observar na Figura 3.

Outro dado relevante refere-se a permanência, nos pacientes, dos cateteres com cultura positiva, que teve um tempo médio de 7,6 dias. Dos pacientes que apresentaram bacteremia (7 em 13), o tempo foi de 13,4 dias.

## DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que aproximadamente 15-25% dos cateteres suspeitos de serem causadores de infecção podem ter cultura positiva (7, 8, 9, 10). Em nosso estudo encontramos um valor de 12,4% (31 em 250).

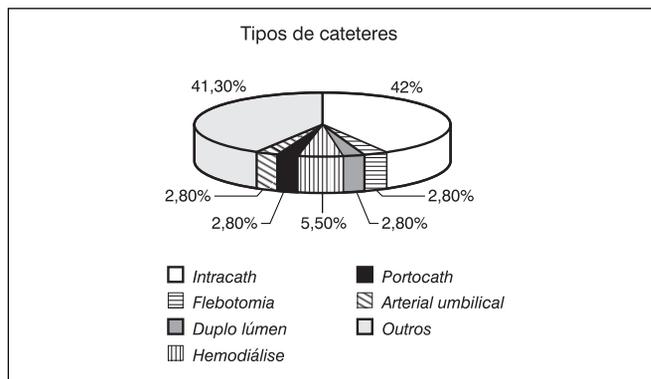


FIG. 1 - Porcentagem de positividade, segundo o tipo de cateter (n=31).

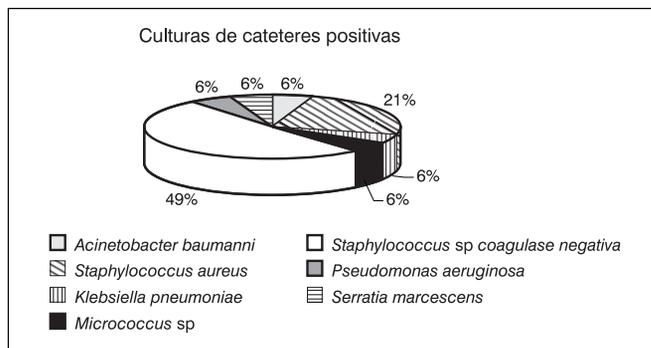


FIG. 2 - Ocorrência de microrganismos em culturas de cateteres.

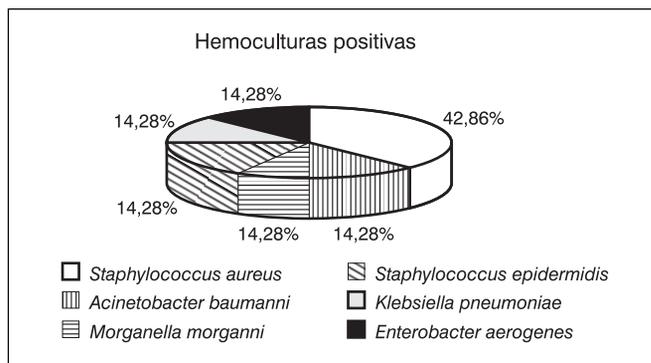


FIG. 3 - Ocorrência de microrganismos em hemoculturas positivas. Observação: o percentual geral ultrapassa 100%, devido à múltipla presença dos microrganismos nas hemoculturas.

Analisando as 7 hemoculturas positivas verificamos que 4 apresentaram o mesmo microrganismo encontrado no cateter, sinalizando uma bacteremia provavelmente devida ao cateter. Se, relacionarmos a bacteremia encontrada, que teve como possível causa a implantação do cateter, com o número de cateteres, verificamos um percentual de 30,77% (4 em 13).

Dos 7 pacientes que apresentaram bacteremia, 4 evoluíram clinicamente para sepse sendo que todos foram à óbito e, destes, 1 teve crescimento do mesmo microrganismo na hemocultura e no cateter, o que pode sugerir o diagnóstico de sepse induzida por cateter.

Segundo Passerini *et al.* (1992) (11), o *Staphylococcus sp. coagulase negativa* ocorre com mais frequência em cultura de cateteres, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*. Neste estudo verifica-se um predomínio de *Staphylococcus sp. coagulase negativa* perfazendo um percentual de

49%, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*. O percentual elevado de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa justifica-se por ser este, um patógeno colonizante da pele, que adere-se à superfície do cateter em aproximadamente 30 minutos (12), desenvolvendo microcolônias em 1 hora, com pesada colonização entre 6 a 12 horas (13). Estas colônias vêm, eventualmente, cobertas por glicocálix - uma barreira aos antibióticos, neutrófilos fagocíticos e macrófagos (14).

Sugere-se que a contaminação dos cateteres pelos demais microrganismos (principalmente, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Citrobacter*), ocorra pela contaminação do fluido intravenoso, administrado através do cateter (15, 16).

Nos cateteres com culturas positivas, o mais freqüente foi o tipo Intracath. Isto pode ser explicado pela alta freqüência de utilização destes como acessos venosos em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo, ou administração de nutrição parenteral.

De acordo com Eyer *et al.* (1990) (17), pacientes que fazem uso de cateter por tempo inferior a 72h, têm incidência de sepse relacionada ao cateter igual a zero. Entretanto, pacientes que fazem uso por mais de 7 dias, têm maior incidência de bacteremia e morte. Neste estudo, a média de uso do cateter foi de 7,6 dias, sendo que aqueles que apresentaram bacteremia, o tempo de permanência foi maior (13,4 dias), comprovando o estudo do Departamento de Epidemiologia do Hospital Henri Mondor-França.

Ao analisarmos o resultado de 7 hemoculturas positivas notou-se a presença do mesmo microrganismo na cultura do cateter em 4 amostras, o que corresponde a 57%. O achado de sepse relacionada ao cateter tem importante impacto (7,7%) (1 em 13), o que demonstra a importante fonte de infecção atribuída a cateteres intravasculares.

Podemos concluir que dos 250 cateteres analisados, possivelmente 4 bacteremias foram causadas pelo cateter e que 1 destes pacientes, que apresentou o mesmo microrganismo no cateter e na hemocultura, foi à óbito, provavelmente devido à sepse induzida por cateter.

## REFERÊNCIAS

1. Rackow, E. C. Clinical definition of sepsis and septic shock. *Society of Critical Care Medicine*. 1-9, 1986.
2. Bone, R. B.; Grodzin, C. G.; Balk, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of disease process. *Chest*. 235-243, 1998.
3. Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B. *et al.* Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. (112):1644-1655, 1992.
4. Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B. *et al.* American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine*. (20):864-874, 1992.
5. Wormser, G. P.; Onorato, I. M.; Preminger, T. J. *et al.* Sensivity and specificity of blood culture obtained through intravascular catheters. *Critical Care Medicine*. (18):152, 1990.
6. Blot, F.; Nitenberg, G.; Chachaty, E.; Raynard, B.; Germann, N. *et al.* Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *The Lancet*. (354):1071-1077, 1999.
7. Maki, D.; Weise, C.; Sarafin, H. A. Semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.* (296):1305-1309, 1977.
8. Ryan, J. A.; Abel, R. M.; Abbott, W. M. *et al.* Catheter complications in total parenteral nutrition: a prospective study of 200 consecutive patients. *N. Engl. J. Med.* (290):757-761, 1974.
9. Brun-Buisson, C.; Legrand, P.; Huet, Y. *et al.* Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch. Intern. Med.* (147):873-877, 1987.
10. Raad, I. I.; Bodey, G. P. Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin. Infect. Dis.* (15):197-210, 1992.
11. Passerini, L.; Lam, K.; Costerton, J. W. *et al.* Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit. Care Med.* (20):665, 1992.
12. Gristina, A. G. Biomaterial-catered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. (237):1588-1595, 1987.
13. Peters, G.; Loui, R.; Pulverer, G. Adherence and growth of coagulase-negative *Staphylococci* on surface of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* (146):479, 1982.
14. Franceschi, D.; Gerding, R. L.; Phillips, G. *et al.* Risk factors associated with intravascular catheter infections in burned patients: A prospective randomized study. *J. Trauma*. (29):811, 1989.
15. Hoppe, B. Central catheter-related infections: pathogenesis, predictors and prevention. *Heart & Lung*. (24):333-341, 1995.
16. Sitges-Serra, A.; Pi-Suner, T.; Garcés, J. M. *et al.* Pathogenesis and prevention of catheter-related septicemia. *Am J Infect Control*. (23):310-6, 1995.
17. Eyer, S.; Brummitt, C.; Crossley, K.; Siegel, R.; Cerra, F. Catheter-related sepsis: prospective, randomized study of three methods of long term catheter maintenance. *Critical Care Medicine*. (18):1073-1079, 1990.

Endereço para correspondência

Tânia B. Filippin

Fac. de Biociências da Pontifícia Univ. Católica do Rio Gde. do Sul - PUCRS  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C - SI 254

Cx. Postal 1429 - 90619-900 - Porto Alegre - RS

## Atualização profissional

### Encontro Nacional de Professores de Análises Clínicas

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas promoverá o Encontro Nacional de Professores de Análises Clínicas durante o XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e o III Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, no período de 8 a 12 de junho de 2003, no Rio de Janeiro, RJ.

Serão apresentados os temas Ensino de Graduação e Pós-Graduação *lato sensu e stricto sensu*, além de palestras sobre temas de atualização.

A SBAC oferecerá inscrição gratuita no Congresso para os professores atuantes nas áreas das análises clínicas. Para tanto, o documento comprobatório será a xerocópia do vínculo empregatício com a instituição onde atua.

Contato:

**Prof. Antenor Pedrazzi**

**E-mail: ahppedrazzi@uol.com.br**

**Tel.: (0xx16)625-4970**

# Detecção de $\beta$ -globina PCR em amostras citológicas cérvico-uterinas: estudo retrospectivo

## PCR $\beta$ -globin detection in cytological uterine cervix samples: retrospective study

Sônia Maria Miranda Pereira<sup>1,PqC</sup>; Marina Yoshiê Sakamoto Maeda<sup>1,PqC</sup>; Alda Wakamatsu<sup>1,PqC</sup>; Suely Nonogaki<sup>1,PqC</sup>; Cecília Roteli-Martins<sup>2,MD</sup> & Adhemar Longatto Filho<sup>1,PqC</sup>

**RESUMO** – Estudos retrospectivos com a sensível técnica da *polymerase chain reaction* (PCR) feitos em esfregaços previamente corados por Papanicolaou pode revelar importantes parâmetros sobre o comportamento biológico das alterações citológicas provocadas por infecções virais e outros agentes mutagênicos. Para isso, o domínio metodológico das reações deve ser confiável e factível. O objetivo do presente estudo foi avaliar a extração do DNA da  $\beta$ -globina por PCR nas amostras cérvico-uterinas em várias condições de preparo para avaliação da qualidade do DNA sob a ação de fixadores, corantes e sua relação com o protocolo utilizado. Para tanto, testou-se esfregaços citológicos preparados sob diferentes condições técnicas de fixação, coloração e montagem. As principais condições envolveram fixação em álcool e *carbowax* esfregaços corados e não corados, montagem com lamínula ou não, e ainda descoloração com HCl. Os *primers* usados para identificação da  $\beta$ -globina foram PCO3 5' – ACACAACGTG-TGTTCACTAGC - 3', e PCO4 5' - CAACTTCATCCACGTTACC - 3'. O conteúdo de DNA extraído e quantificado variaram de 23,46 ng/ $\mu$ L a 734,40 ng/ $\mu$ L. Somente amostras fixadas em álcool 100% e *carbowax* sem a coloração pelo método de Papanicolaou amplificaram 110 pares de bases do gene de  $\beta$ -globina. Pelo protocolo analisado ficou evidente que estudos retrospectivos em séries previamente coradas pelo método de Papanicolaou apresentam importantes limitações para suas realizações. Para superar essas limitações temos que estudar novos protocolos que superem os fatores inibitórios oriundos dos processos de fixação e sobre tudo coloração.

**PALAVRAS-CHAVE** – Papanicolaou, PCR,  $\beta$ -globina.

**SUMMARY** – Retrospective studies with polymerase chain reaction (PCR) methodology in cytological smears previously stained with Papanicolaou could reveal important parameters about the biological behavior of cytological alterations induced by viral infection and other mutagenic agents. To obtain such informations, methodology should be reliable. The goal of this study was to evaluate the extraction  $\beta$ -globin DNA using PCR in uterine cervix samples prepared under several conditions such as fixation and stain. We have tested cytological smears prepared with different types of fixation, stain and mounting medium. The main conditions were: fixation with absolute ethanol or *carbowax*, previous stain or not, type of mounting and decoloration with HCl. The primers used for  $\beta$ -globin identification were: PCO3 5' – ACACAACGTGTTCACTAGC - 3', e PCO4 5' - CAACTTCATCCACGTTACC - 3'. DNA content extracted and measured ranged from 23.46 ng/ $\mu$ L a 734.40 ng/ $\mu$ L. The amplification of 110 pairs of base gene de  $\beta$ -globin was observed in alcohol and *carbowax* without previous Papanicolaou stain. From the protocol used for this study is evident that retrospective studies in cytological smears previously stained with Papanicolaou method show important limitations. Further studies with alternative protocols can optimize the reactions and avoid the inhibitors factors inherent in stain and fixation process.

**KEYWORDS** – Papanicolaou, PCR,  $\beta$ -globin.

### INTRODUÇÃO

A análise de alterações moleculares do DNA, bem como a detecção de uma bactéria específica ou genoma viral, tem sido facilitada pelo uso do método de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Segmentos de ácidos nucleicos podem ser amplificados em numerosas cópias a partir de uma pequena quantidade de material genético<sup>5</sup>.

Uma maneira de atestar a qualidade das amostras

genitais submetidas à análise do PCR é avaliar a presença de DNA  $\beta$ -globina<sup>3</sup>.

A possibilidade de estudar DNA em lâminas de secreção cérvico-uterina coradas pelo método de Papanicolaou obtidas de arquivo pode ser de grande valia em estudo retrospectivo<sup>5</sup>.

Uma variedade de corantes são utilizados na coloração de lâminas citológicas pelo método de Papanicolaou para detecção de agentes infecciosos, lesões precursoras de neoplasia e neoplasia do colo uterino<sup>7</sup>.

Recebido em 2/7/2002  
Aprovado em 3/7/2002

<sup>1</sup>Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP; <sup>2</sup>Hospital Leonor Mendes de Barros, São Paulo, SP

Estudos demonstraram que vários fatores podem impedir a detecção de agentes infecciosos em amostras cervicais quando submetidas ao PCR. Amostras que não puderam ser analisadas pelo comprometimento da integridade do DNA continham algum tipo de inibidores<sup>1,3</sup>.

Outros estudos demonstraram que o muco cervical é o maior inibidor da amplificação pelo PCR em amostras cervicais<sup>2</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a extração do DNA da  $\beta$ -globina por PCR nas amostras cérvico-uterinas em várias condições de preparo para avaliação da qualidade do DNA sob a ação de fixadores, corantes e sua relação com o protocolo utilizado.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados para a confecção dos esfregaços cérvico-uterinos, a escova (*cytobrush*) para coleta de células da endocérvice e a espátula de Ayre para a coleta de células da vagina e ectocérvice (Tab. I).

Na coloração pelo método de Papanicolaou foi utilizado corantes de Hematoxilina de Harris, Orange G, Eosina Amarelada (EA36) e solventes como álcool e xilol. Alguns grupos de amostras foram montadas com resina balsâmica e lâmina. Outro grupo de amostras foram submetidas à descoloração pelo ácido clorídrico a 1%.

### Extração do DNA

O DNA foi isolado de acordo com o protocolo descrito pelo GAL *et al.* (1993) modificado<sup>4</sup>: Os esfregaços foram imersos em xilol para remoção da lâmina. Uma segunda imersão em xilol para remoção da resina balsâmica. O material das lâminas foi retirado delicadamente com lâmina de bisturi esterilizada e transferidas para ependorfs contendo 1,0mL de xilol.

As amostras foram vortexadas em xilol e aquecidas em banho-maria por 10min a 37°C seguida de centrifugação a 10000rpm por 5min. O xilol foi removido e adicionado etanol a 100% vortexando em temperatura ambiente deixando secar totalmente. Para digestão, as amostras foram incubadas overnight a 60°C imersas em solução de 375 $\mu$ L de acetato de sódio 2M, 25 $\mu$ L de SDS a 10% e 5 $\mu$ L de proteinase K (125mg/mL diluído em água). Foi adicionado 120 $\mu$ L de solução de fenol-clorofórmio e álcool isoamílico (24:24:1). Os tubos foram centrifugados (3 minutos a 10000 rpm) e 1,0mL de etanol a 100% foi adicionado ao sobrenadante e incubado a -40°C "overnight" para precipitação do DNA. Depois foram centrifugados e o "pellet" foi resuspenso com 50 $\mu$ L de água deionizada estéril.

Os DNAs extraídos foram medidos em um espectrofotômetro (HP-8453) (5 $\mu$ L do DNA extraído diluído em 1000 $\mu$ L de água deionizada estéril) a 260nm (Tab. II, III e IV).

Produtos da PCR obtidos da extração do DNA dos esfregaços citológicos foram separados pela eletroforese de gel de agarose a 1,5% e de poli(acrilamida) a 7%.

- Controle positivo para  $\beta$ -globina: DNA isolado de sangue periférico.
- Controle negativo: água
- Marcador molecular: ladder de 110pb

**TABELA I**  
**Amostras e condições de preparo**

Grupos	Fixadores	Método de Coloração	Meio de Montagem	Lamina	Outros
1	Carbowax (Polietileno glicol)	Papanicolaou (Pap)	Resina	Sim	Descoloração com HCl 1%
2	Carbowax	Não	Não	Não	Não
3	Carbowax	Pap	Resina	Sim	Não
4	Álcool 100%	Pap	Resina	Sim	Não
5	Álcool 100%	Pap	Não	Não	Não
6	Álcool 100%	Não	Resina	Sim	Não
7	Álcool 100%	Não	Não	Não	Não

**TABELA II**  
**Primers usados para identificação da  $\beta$ -globina**

Primers	$\beta$ -globina
PCO3	5' - ACACAACCTGTGTTCACTAGC - 3'
PCO4	5' - CAACTTCATCCACGTTCCACC - 3'

**TABELA III**  
**Solução de mix usado para a amplificação da  $\beta$ -globina**

Reagentes	Volume - $\mu$ L
Água deionizada estéril	32.50
10 X PCR buffer	5.00
dNTPs - 10 mM	1.0
Primer - sense - PCO3	0.5
Primer - antisense - PCO4	0.5
Taq DNA polymerase - 5 U/ $\mu$ L	0.5
DNA	10
Final volume	50

**TABELA IV**  
**Amplificação da  $\beta$ -globina realizada em um termociclador (Genius Techne Ltda, Inglaterra)**

Programa para $\beta$ -globina
1 ciclo 5 min à 94°C
35 ciclos 1 min à 94°C
1min 30 seg à 53°C
2 min à 72°C
1 ciclo 7 min à 72°C

## RESULTADO

O DNA extraído e quantificado através de leituras obtidas pelo espectrofotômetro a 260nm variaram de 23,46 ng/ $\mu$ L a 734,40 ng/ $\mu$ L.

Somente amostras fixadas em álcool 100% e carbowax, sem a coloração pelo método de Papanicolaou, amplificaram 110 pares de bases do gene de  $\beta$ -globina, visualizados em gel de agarose e poli(acrilamida) (Fig. 1). Os demais casos foram negativos independente dos métodos de preparo utilizados.

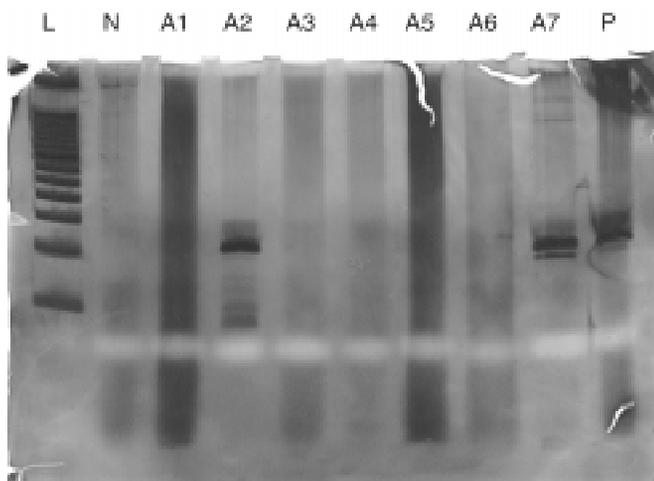


FIG. 1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 7% de produtos da PCR obtidos da extração de amostras cérvico-vaginais.

Legenda: L = Ladder (50); N = Controle negativo; A1 = amostra do grupo 1; A2 = amostra do grupo 6; A3 = amostra do grupo 3; A4 = amostra do grupo 4; A5 = amostra do grupo 5; A6 = amostra do grupo 1; A7 = amostra do grupo 7; P = controle positivo

## DISCUSSÃO

A  $\beta$ -globina tem sido usada como um marcador de viabilidade para as reações de PCR. Apesar disso, existem muitos fatores que podem inibir sua expressão e impedindo uma reação negativa para  $\beta$ -globina como um marcador específico. Muitas vezes, uma reação negativa para  $\beta$ -globina pode ter uma pesquisa satisfatória de DNA de um agente etiológico específico. A reação de PCR para identificação de  $\beta$ -globina é portanto praticável mas não dispensa o uso de controle interno<sup>3</sup>.

Em amostras previamente coradas pelo método de Papanicolaou, a coloração e os métodos de fixação são muitas vezes apontados como importantes inibidores de uma reação de PCR para pesquisa de  $\beta$ -globina. Alguns autores destacam que apenas alguns corantes do método teriam um potencial inibidor, como o Orange G; uma vez misturada ao EA e a Hematoxilina, o Orange G perderia essa capacidade de inibir a reação de PCR. Embora não haja clara evidência da ação do Orange G, a coloração de Papanicolaou tem-se mostrado uma importante limitação para estudos retrospectivos em material previamente corados, posto que alguns autores conseguiram otimizar suas reações após a descoloração dos esfregaços com solução de HCl<sup>1</sup>.

Em nossa experiência todas as lâminas previamente coradas e mesmo aquelas descoradas por HCl resultaram negativas, enfatizando a ação limitante da coloração para a reação de PCR.

Um outro fator limitante às reações de PCR é a fixação. Muitos autores tem destacado a ação inibitória dos agentes fixadores e/ou tempo de fixação<sup>5</sup>. Em nosso estudo porém, essa ação inibitória não foi tão marcante uma vez que conseguimos reações satisfatórias tanto nas amostras fixadas com álcool 100% ou carbowax.

A celularidade dos esfregaços selecionados para análise também deve ser considerada, pois há fortes evidências de que amostras com baixo número de células são mais susceptíveis às reações de PCR insatisfatórias<sup>6</sup>. Em nosso estudo seguimos a premissa de selecionarmos casos com grande celularidade para tentarmos evitar reações negativas por falta de material nuclear.

Pelo protocolo analisado nesse estudo fica claro que estudos retrospectivos em séries previamente coradas pelo método de Papanicolaou apresentam importantes limitações para suas realizações. Para superar essas limitações temos que estudar novos protocolos que superem os fatores inibitórios oriundos dos processos de fixação e sobre tudo coloração.

## REFERÊNCIAS

1. Chen, Jung-Ta; Lane, M. A; Clark, D. P. Inhibitors of the Polymerase Chain Reaction in Papanicolaou stain. Removal with a Simple Destaining Procedure. *Acta. Cytol.* 40(5):873-877, 1996.
2. Clad, A.; Naudascher, I.; Flecken, U.; Freidank, H. M.; Petersen, E. E. Evidence of labile inhibitors in the detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical specimens by Polymerase Chain Reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:744-747, 1996.
3. Coutlée, François; Ladurantaye, M.; Tremblay, C.; Vincelette, J.; Labrecque, L.; Roger, M. An important proportion of genital samples submitted for *Chlamydia Trachomatis* detection by PCR contain small amounts of cellular DNA as measured by  $\beta$ -globin gene amplification. *J. Clin. Microbiol.* 38(7):2512-2515, 2000.
4. Gall, K.; Pavelic, J.; Audy-Jurkovic, S.; Pavelic, K. PCR amplifications of DNA from stained cytological smears. *J. Clin. Pathol.* 46: 378-379, 1993.
5. Pavelic, J.; Gall-Troselj, K.; Herak Bosnar, M.; Kardum, M. M.; Pavelic, K. PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. *Neoplasma.* 43(2):75-81, 1996.
6. Puranen, M.; Saarikoski, S.; Syrjänen, K.; Syrjänen, S. Polymerase Chain Reaction amplification of human *Papillomavirus* DNA from archival, Papanicolaou-stained cervical smears. *Acta. Cytol.* 40(3): 391-395, 1996.
7. Woods G. I.; Walker D. H. Detection of infection or infectious agents by use of cutologic and histologic stains. *Clin. Microbiol Rev.* 9(3):382-404, 1996.

Endereço para correspondência

Sônia Maria Miranda Pereira

Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Patologia

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira Cesar - 01246-902 - São Paulo, SP

Fax (0xx11)3085-3505

## O quê está achando da RBAC?

Queremos saber a sua opinião sobre a nossa revista.

A sua colaboração, elogio, crítica, sugestão, podem ser encaminhadas através do nosso e-mail:

**geral@sbac.org.br**

ou pelo fax **(0xx21)2264-4449**

# Displasias ectodérmicas do grupo A: elaboração de um banco de dados informatizado para auxílio ao diagnóstico genético-clínico

Toni Lisboa Costa<sup>1,2</sup>; Nina A. B. Pagnan<sup>1</sup>; Newton Freire-Maia<sup>1</sup>; Remy Lessnau<sup>1</sup> & Eduardo E. Sordi<sup>2</sup>

**RESUMO** – As displasias ectodérmicas são afecções em que ocorre comprometimento das estruturas derivadas da ectoderme, constituindo um grupo nosológico grande e complexo. Freire-Maia, em 1971 e 1977, propôs uma definição clínica e uma classificação clínico-mnemônica das displasias ectodérmicas, dividindo-as em 2 grupos principais (A e B), de acordo com a presença de sinais clássicos em estruturas relacionadas a pêlos, dentes, unhas e glândulas sudoríparas.

**OBJETIVOS:** Este projeto teve como objetivos principais: 1) A análise da literatura sobre as displasias ectodérmicas já descritas, com relação aos aspectos genéticos e clínicos. 2) A atualização da classificação de Freire-Maia (1971, 1977), revista por Pinheiro e Freire-Maia (1994), com a realização das alterações necessárias no grupo A (união de afecções descritas anteriormente como distintas, mudanças de subgrupo, inclusão de novas afecções encontradas na literatura). 3) A criação de um sistema de controle informatizado (disponível em Home Page na Internet), responsável pelo gerenciamento de um banco de dados contendo as informações obtidas, bem como um banco de imagens selecionadas, referentes às displasias ectodérmicas conhecidas e também um sistema de pesquisa, onde as informações fornecidas pelo usuário (de acordo com os sinais clínicos do paciente) são confrontadas com o banco de dados, resultando na filtragem das possíveis displasias ectodérmicas.

**RESULTADOS:** O banco de dados encontra-se disponível na Internet no endereço <http://displasias.bio.ufpr.br>. Cada afecção foi analisada individualmente, tendo sido elaborado para cada uma delas uma "ficha", com os seguintes dados: Informações gerais, aspectos genéticos, sinais clínicos clássicos, outros sinais freqüentes, comentários e referências bibliográficas utilizadas. Um banco de imagens e sistemas de pesquisa (por palavra chave e por critérios clínicos) também foram disponibilizados.

**CONCLUSÕES:** Este trabalho ampliou o número de displasias ectodérmicas conhecidas para 192 (grupo A). A maioria das displasias ectodérmicas tem herança autossômica recessiva (38%), seguidas das que possuem herança autossômica dominante (28%). As displasias ligadas ao X constituem 5% e os 29% restantes incluem síndromes cuja etiologia não é conhecida.

**PALAVRAS-CHAVE** – Genética; displasias ectodérmicas; banco de dados.

## INTRODUÇÃO

As displasias ectodérmicas são afecções em que ocorre comprometimento das estruturas derivadas da ectoderme, constituindo um grupo nosológico grande e complexo. Freire-Maia, em 1971 e 1977, propôs uma definição clínica e uma classificação clínico-mnemônica das displasias ectodérmicas, dividindo-as em 2 grupos principais (A e B), de acordo com a presença de sinais clássicos em estruturas relacionadas a pêlos, dentes, unhas e glândulas sudoríparas.

## OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos principais:

1) A análise abrangente da literatura sobre as displasias ectodérmicas já descritas, com relação aos aspectos genéticos (padrão de herança, gene responsável, localização cromossômica, produto protéico e suas funções) e clínicos (descrição fenotípica, sinais cardinais, etc.).

2) A atualização da distribuição das displasias ectodérmicas na classificação clínico-mnemônica de Frei-

re-Maia (1971, 1977), revista por Pinheiro e Freire-Maia (1994), com a realização das alterações necessárias (união de afecções descritas anteriormente como distintas, mudanças de subgrupo, etc.).

3) A inclusão de novas afecções encontradas na literatura, com pelo menos dois sinais relacionados a pêlos, dentes, unhas e sudorese (grupo A), agrupando-as segundo a classificação clínico-mnemônica das displasias ectodérmicas proposta por Freire-Maia (citada acima).

4) A criação de um sistema de controle informatizado (disponível em Home Page na Internet), responsável pelo gerenciamento de:

- Um banco de dados contendo as informações obtidas, bem como um banco de imagens selecionadas, referentes às displasias ectodérmicas conhecidas;
- Um sistema de pesquisa, onde as informações fornecidas pelo usuário (de acordo com os sinais clínicos do paciente) são confrontadas com o banco de dados, resultando na filtragem das possíveis displasias ectodérmicas.

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 11/7/2002

\*Prêmio HOTSOF - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

<sup>1</sup>Departamento de Genética, UFPR; <sup>2</sup>Setor de Genética, Laboratório Alvaro (Cascavel, PR);  
Manual de utilização - informações gerais: <http://displasias.bio.ufpr.br>

As displasias ectodérmicas formam um grupo nosológico com 192 afecções, em geral de natureza genética. Nos últimos 10 anos, mais de 800 artigos foram publicados na literatura científica mundial (*Advanced Pubmed Search - Entrez - Medline*, 2000), nas mais diferentes áreas de atuação (genética médica/clínica, biologia molecular, pediatria, dermatologia, odontologia, neurocirurgia, dismorfologia, etc.). Diversos artigos de revisão foram apresentados (Freire-Maia, 1971, 1977; Solomon e Keuer, 1980; Freire-Maia e Pinheiro, 1984a, 1987, 1988; Solomon *et al.*, 1987; Pinheiro e Freire-Maia, 1994, 1996), evidenciando a necessidade da atualização contínua dos dados obtidos e a busca de novas informações.

A velocidade com que ocorreu a ampliação dos conhecimentos genéticos aumentou, principalmente na última década, com o desenvolvimento de pesquisas na área da genética molecular e o advento das novas tecnologias de DNA, possibilitando o reconhecimento da localização e função dos diversos genes, bem como dos produtos protéicos envolvidos e suas respectivas funções.

É necessário salientar a importância da sistematização na prática de genética clínica e médica, ou seja, a importância de classificações (para grupos nosológicos com base em critérios clínicos), com a finalidade de auxiliar no diagnóstico e no aconselhamento genético. Numerosos exemplos podem ser citados além da classificação clínico mnemônica de Freire-Maia para as displasias ectodérmicas, como a classificação de síndromes com camptodactilia (Pagnan, 1988) e a classificação das artrogrupos (Hall, 1985).

Atualmente, faz-se necessária a utilização do campo da informática, com o advento dos recursos de multimídia que foram criados e desenvolvidos, bem como o aparecimento da Internet, que como meio de comunicação propicia uma troca constante e rápida de informações. Diversos programas na área de Genética foram criados, com a finalidade de servirem como ferramentas auxiliares ao geneticista clínico ou pesquisador, sendo utilizados pela comunidade científica e citados com frequência na literatura mundial. A realização de um banco de dados informatizado atualizado, disponível na Internet, envolvendo o grupo nosológico das displasias ectodérmicas é, portanto, útil, necessária e justificável.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para a realização deste projeto foram realizados em uma série de etapas descritas a seguir.

### Revisão bibliográfica abrangente da literatura mundial

As informações pertinentes sobre as displasias ectodérmicas (aspectos genéticos e clínicos) foram obtidas de periódicos após revisão através do PubMed (*Advanced PubMed Search - Entrez - Medline*, 2000). Este sistema de pesquisa, disponível pelo *Entrez Retrieval System* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), foi desenvolvido pelo Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI), nos Estados Unidos, em conjunto com editores de literatura biomédica, para ser utilizado como ferramenta para levantamento bibliográfico.

Livros de referência sobre o assunto também foram utilizados, como o "Ectodermal Dysplasias: a Clinical and Genetic Study" (Freire-Maia e Pinheiro, 1984a - a base para a realização do projeto) e o BDE - "Birth Defects Encyclopedia" (Buyse, 1990).

Além disso, foram utilizados alguns programas informatizados, disponíveis em CD-ROM ou encontrados na Internet, e que são atualizados continuamente, como o OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, 2000), o *GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases* (GeneCards, 2000), o *SWISS-PROT annotated protein sequence database* (SWISS-PROT, 2000), o *GDB - Genome Database* (GDB, 2000), e o *POSSUM - Pictures of Standard Syndromes and Undiagnosed Malformations* (POSSUM, 1994).

### Organização das displasias ectodérmicas (grupo A) segundo a classificação clínico-mnemônica de Freire-Maia (1971, 1977)

Após a análise da literatura, verificou-se a necessidade da realização de alterações em relação à última revisão (Pinheiro e Freire-Maia, 1994), como, por exemplo, a união de afecções descritas anteriormente como distintas, mudanças de subgrupo, ou ainda a inclusão de novas afecções encontradas na literatura, nos diferentes subgrupos do grupo A.

Os 11 subgrupos da classificação de Freire-Maia foram dicotomizados com base em critérios clínicos, até que se chegasse a uma única displasia (segundo técnicas de elaboração de chaves de identificação). Uma chave corresponde a um esquema ou arranjo analítico artificial, que proporciona uma escolha entre duas proposições contraditórias, dela resultando a aceitação de uma e rejeição de outra.

Este processo foi fundamental para o funcionamento do *software*, uma vez que os critérios usados na dicotomização vêm a ser os filtros clínicos (que selecionam as informações da base de dados).

### Criação de um sistema de controle informatizado

Para esta etapa, foi necessária a definição clara da quantidade de dados a serem armazenados e qual seria a plataforma do computador servidor (local onde são armazenados os dados, para a disposição do conteúdo *online* na Internet), já que, dependendo dessas informações, as opções existentes poderiam ser completamente divergentes. Após reuniões com os responsáveis pelo servidor da Universidade Federal do Paraná (Setor de Ciências Biológicas), local onde estaria locada a *Home Page* após o seu término, ficou definido que a plataforma utilizada seria o Windows NT Server 4.0 (*Microsoft Corporation*, 1997b), com o servidor Web IIS - Internet Information Server 4.0 (*Microsoft Corporation*, 1997a). Com estas informações, foi então escolhido o Microsoft Access 2000 (*Microsoft Corporation*, 1999) como o formato para o banco de dados, considerando a sua facilidade de utilização, bem como, a sua compatibilidade com diversos outros modelos de bancos de dados existentes, caso fosse necessária a posterior exportação. Para o auxílio na linguagem de consulta ao banco de dados, foi utilizado também o padrão ASP (*Active Server Page*), na composição das páginas que incluíam *scripts* (instruções a serem seguidas), tendo como base a linguagem SQL (*Structured Query Language*) (*Microsoft Corporation*, 1999).

**Elaboração de um banco de dados, contendo as informações de cada displasia ectodérmica encontrada, e de um sistema de pesquisa (filtros por palavra-chave e por critérios clínicos)**

O banco de dados apresentou duas linhas distintas de trabalho:

- 1) o cadastro das 192 displasias ectodérmicas previamente analisadas, com suas respectivas informações;
- 2) a utilização de sistemas de pesquisa (filtros por palavra-chave e por critérios clínicos). Foi então definida uma linha principal de modelagem, que consistiu na elaboração de duas estruturas principais (uma para cada respectiva situação).

**Elaboração de um banco de imagens das displasias ectodérmicas**

Para a realização do banco de imagens, foi selecionado material fotográfico pertencente ao CEDE (Centro de Estudos de Displasias Ectodérmicas), que corresponde a casos publicados pelo professor Newton Freire-Maia e inúmeros colaboradores. Foram escolhidas 15 fotografias, referentes a 8 displasias ectodérmicas. O CEDE dispõe de autorização para utilização das imagens (Anexos 1 a 9).

**Desenvolvimento da Home Page**

Esta etapa consistiu na incorporação dos dados previamente digitados para o formato HTML (*Hyperlink Text Markup Language*), que é a linguagem padrão usada para a disponibilização de documentos na Internet.

Para a criação de uma programação visual dos documentos, visando atingir uma interface simples, agradável e rápida, agregada ao conteúdo HTML, foram inseridas na maioria das páginas imagens desenvolvidas em FLASH 5.0 (Macromedia Inc, 2000), um *software* de desenvolvimento e composição de imagens animadas, o que permitiu a inclusão de um *layout* com efeitos que não puderam ser desenvolvidos em HTML básico.

**Simulação de casos para a verificação da funcionalidade do programa**

O banco de dados foi inserido no servidor da UFPR, no endereço <http://displasias.bio.ufpr.br>, tendo sido realizados vários testes para a visualização do funcionamento das diversas funções apresentadas (fichário das displasias ectodérmicas, sistemas de pesquisas, visualização de textos e tabelas, ativação dos links, visualização de imagens selecionadas, endereço eletrônico dos responsáveis pelo projeto, créditos, etc.).

**RESULTADOS**

**Banco de dados**

**Visão geral**

O banco de dados com as informações referentes às displasias ectodérmicas encontra-se disponível na Internet no endereço <http://displasias.bio.ufpr.br>. Abaixo estão alguns exemplos do produto final (ilustrações extraídas da Internet), com a visualização dos diferentes componentes do software.

**Classificação atual das displasias ectodérmicas**

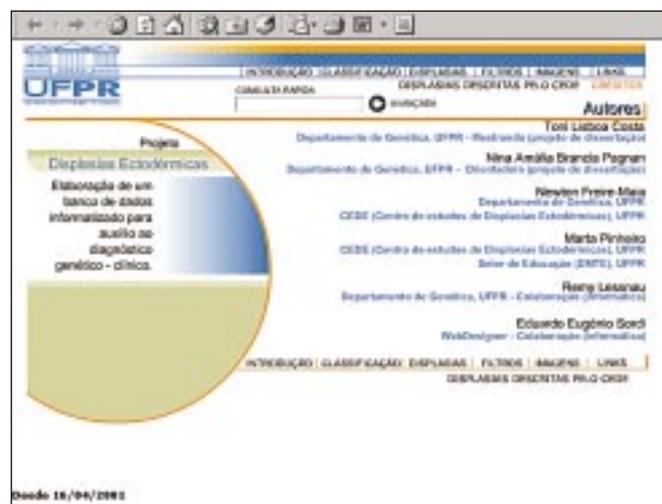
Em cada subgrupo na classificação de Freire-Maia, as displasias ectodérmicas foram analisadas individualmente, tendo sido elaborado para cada uma delas uma "ficha", com os seguintes dados:

- Informações gerais: nome da displasia ectodérmica e seus respectivos sinônimos, subgrupo ao qual a afecção pertence (de acordo com os critérios da classificação de Freire-Maia).
- Localização das displasias em livros de referência sobre o assunto e também em bancos de dados informatizados (disponíveis em CD-ROM ou na Internet): OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, 2000), POSSUM (*Pictures of Standard Syndromes and Undiagnosed Malformations* - versão 4.0, 1994), BDE (*Birth Defects Encyclopedia* - Buyse, 1990), Freire-Maia e Pinheiro - 1984 (*Ectodermal Dysplasias: A Clinical and Genetic Study* - Freire-Maia e Pinheiro, 1984a).
- Aspectos genéticos: etiologia, localização cromossômica, nome do gene, produto gênico (proteína).
- Sinais clínicos clássicos (relacionados com a inserção da displasia no subgrupo ao qual pertence): pêlos, dentes, unhas, glândulas sudoríparas.
- Outros sinais de ocorrência relativamente frequentes: pele, audição, olhos, face, desenvolvimento psicomotor e de crescimento, membros, outros achados.
- Comentários pertinentes a cada displasia ectodérmica e referências bibliográficas utilizadas.

Este projeto apresenta uma atualização da classificação de Freire-Maia (1971, 1977), ampliando o número de displasias conhecidas (grupo A) de 154 (Pinheiro e Freire-Maia, 1994) para 192.

**Apresentação do projeto**

**Página Inicial**



# DISPLASIAS ECTODÉRMICAS

## Introdução

**DISPLASIAS**

O termo displasia é empregado para designar o processo e as conseqüências de um distúrbio da histogênese, ou seja, refere-se fundamentalmente a um defeito da organização tissular. Do ponto de vista clínico, considera-se a existência de dois tipos básicos de displasias: as puras ou sensu stricto e as sindrômicas ou sensu lato. Nas displasias puras os sinais observados nos afetados são atribuíveis apenas às alterações tissulares, ou seja, são sinais exclusivamente displásicos. Nas síndromes, além dos sinais displásicos, ocorrem malformações, constituindo uma associação entre distúrbios da histogênese e da organogênese.

As displasias puras são classificadas em 2 grupos, tendo como critérios o número de sinais displásicos e o número de folhetos germinativos comprometidos. As monodiplasias são afecções em que um único sinal displásico é observado (ex.: displasia da dentina), ao contrário das polidiplasias, onde dois ou mais sinais existem. Com relação ao número de folhetos germinativos, existem as unidiplasias (displasia em que há comprometimento de um único folheto), e multidiplasias (aquelas em que mais de um folheto está envolvido).

**DISPLASIAS ECTODÉRMICAS**

As displasias ectodérmicas são as afecções em que há comprometimento das estruturas derivadas da ectoderme, como a epiderme e seus anexos. Constituem um grupo nosológico grande e complexo que inclui mais de cento e noventa entidades, a maioria rara e com etiologia genética. As displasias determinadas geneticamente têm, na sua maioria, herança monogênica (ex.: síndrome de Christ-Siemens-Touraine, de herança recessiva ligada ao X; síndrome de Papillon-Lévyne, de herança autossômica recessiva) e dentre elas há casos de suposta heterogeneidade de locos (ex.: síndrome de Coffin-Siris; síndrome de Holman-Bonifant). Dentro do grupo das displasias ectodérmicas há ainda afecções de causa desconhecida (ex.: síndrome de Carey) e várias outras cujo mecanismo de herança é duvidoso (ex.: síndrome de Gorlin-Chaudry-Moss, possivelmente herdada de modo autossômico recessivo).

## Fichário geral

**Displasias Ectodérmicas - Fichário**

Displasia	Identificação
Síndrome de Christ-Siemens-Touraine	1234-1
Displasia ectodérmica hipodérmica autossômica recessiva	1234-2
Hipoplasia dental focal (DHDF)	1234-3
Dondosidade, pilosidade e defeitos no ouvido	1234-4
Síndrome de Russell-Silver	1234-5
Dondosidade congênita, tipo Scargill	1234-6
Dondosidade congênita autossômica recessiva	1234-7
Dondosidade congênita ligada ao X	1234-8
Papilomatose congênita, tipo 1	1234-9
Papilomatose congênita, tipo 2	1234-10

## Filtro por palavra(s) chave(s)

**Filtros**

Consulta ao banco de dados das Displasias Ectodérmicas através do uso de palavra(s) chave(s)

Consultar  Enviar consulta  Reseta

Linguagem de consulta

Digite-se o termo desejado (Ex. Hipotricose), sem a utilização de caracteres especiais (Ex. %, +, -, etc.)

PRINCIPAL • INTRODUÇÃO • CLASSIFICAÇÃO • DISPLASIAS • FILTROS • LINKS  
IMAGENS • DISPLASIAS DESCRITAS PELO CIEP

## Classificação

**CLASSIFICAÇÃO**

O pesquisador brasileiro Newton Freire-Maia propôs uma classificação clínico-nosológica para as displasias ectodérmicas (1971, 1977), hoje utilizada por pesquisadores e clínicos do mundo todo. Essa classificação divide as displasias em 2 grupos principais: A e B. Pertencem ao grupo A aquelas em que há defeitos em pelo menos duas estruturas relacionadas a pêlos, dentes, unhas e sudorese, acompanhados ou não de malformações. O grupo B abrange as afecções com defeitos em apenas uma das quatro estruturas mencionadas acima, além de pelo menos um outro defeito de origem ectodérmica.

Os sinais associados a pêlos, dentes, unhas e glândulas sudoríparas são rotulados, respectivamente, como 1, 2, 3 e 4, o que permite definir 11 subgrupos no grupo A, pela reunião dos diferentes defeitos (subgrupos 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4, 1-2-3, 1-2-4, 1-3-4, 2-3-4 e 1-2-3-4). As afecções pertencentes ao grupo B são definidas pelo número que corresponde à estrutura afetada, reunido ao número 5, usado para indicar o outro defeito de origem ectodérmica. Nesse grupo, portanto, há 4 subgrupos (1-5, 2-5, 3-5 e 4-5).

PRINCIPAL • INTRODUÇÃO • CLASSIFICAÇÃO • DISPLASIAS • FILTROS • LINKS  
IMAGENS • DISPLASIAS DESCRITAS PELO CIEP

## Etiologia - Cromossomos - Genes - Proteínas

**Displasias Ectodérmicas - Etiologia - Cromossomos - Genes - Proteínas**

Displasia ectodérmica	Etiologia	Cromossomo	Gene	Proteína
1 Síndrome de Christ-Siemens-Touraine	XR	1q24-q31	SOX1 ou SOX4	Endonexina A
2 Displasia ectodérmica hipodérmica autossômica recessiva	AR	3q17-q23	ED3	-
3 Hipoplasia dental focal (DHDF)	AD	8	DHDF	-
4 Dondosidade congênita ligada ao X	XR	Xq28	SOX1	Endonexina
5 Papilomatose congênita, tipo 1	AD	17p13-q11 (13q31)	KRT5, KRT6A	Queratina 5; Queratina 6A
6 Papilomatose congênita, tipo 2	AD	17p13-q11 (13q31)	KRT5, KRT6B	Queratina 5; Queratina 6B
7 Endodermia, displasia ectodérmica e hipoplasia dental 1 (EED1)	AD	17p13-q11	EDC1	-
8 Síndrome de Jarrold-Randall	AD	10p15-q11	ED4	-
9 Síndrome de Papillon-Lévyne	AR	11p15.1-q13.3	OTSC1	Calopina C
10 Displasia de Cornélio	AD	16q25-q26	ED6	-
11 Agnatoses de folheto ao X	XR	19p11	-	-
12 Síndrome de Jacquot-Coupl	AR	11q23-q24	PHF11	Nucleo 1
13 Endodermia, displasia ectodérmica e hipoplasia dental 2 (EED2)	AD	16	ED02	-
14 Síndrome de Palfrensd-Touraine (PTE)	AR	9q24.3	HEC3A	HEC3A
15 Síndrome de Ouzouni	AD	12p12	ED8	Corneína 3B
16 Síndrome de Cornélio	AD, XRT, XOT	12p12-q11	-	-
17 Síndrome trico-dento-dérmica	AD	17p13.1-q22	ED3	Proteína homocod 5, 9
18 Dondosidade pigmentar	AD	19p11.3 (19q13.3)	SP1, SP30	Serpinidina 1, 3
19 Síndrome de Miescher-Balangout, tipo 1 (MBP1)	AR, XRT	9q24.32	MBP1	-
20 Síndrome de Miescher-Balangout (MBC)	AR	Xq28	MBC	-
21 Síndrome de Cornélio	AD	12p12	ED1	-

## Ficha individual

**Síndrome de Christ-Siemens-Touraine**

**Identificação:** 1234-1

**Subgrupo:** 3-2-3-4

**Defeito:** Síndrome de Christ-Siemens-Touraine

**Definição:** Displasia ectodérmica anidróica (ED); síndrome OST; displasia ectodérmica anidróica; SOA; SOA1; displasia ectodérmica hipodérmica; HED; displasia ectodérmica hipodérmica ligada ao X; HED0; SOA0; displasia ectodérmica ligada ao X; displasia ectodérmica anidróica; Síndrome de Barera-Touraine; polidiplasia ectodérmica; defeito ectodérmico congênito; síndrome da anidrose-hipotricose-anodermia; anidrose hipotricose ligada ao X; displasia ectodérmica keratinária; síndrome de Jacquot; dermatose de Barera; síndrome de Barera; síndrome de Treusch; ectodiplasia A; ectodiplasia.

**OMIM:** 305180

**POISSON:** 3208

**ED3:** 3233

**Freire-Maia e Pinheiro (1994):** 1234-1

**Etiologia:** XR

**Cromossomo:** 11q12-q13.1

**Gene:** SOX1 ou SOX4

## DISPLASIAS ECTODÉRMICAS

### Filtros clínicos

De acordo com os sinais clínicos encontrados, relativos a pêlos (1), dentes (2), unhas (3) e sudorese (4), clique abaixo no subgrupo desejado:

- Subgrupo 1-2-3-4
- Subgrupo 1-3-2
- Subgrupo 1-2-4
- Subgrupo 1-3-4
- Subgrupo 2-3-4
- Subgrupo 1-2
- Subgrupo 1-3
- Subgrupo 1-4
- Subgrupo 2-3
- Subgrupo 2-4
- Subgrupo 3-4

### Links úteis

- Universidade Federal do Paraná (UFPR)
- Departamento de Genética - UFPR
- Centro de Estudos de Displasias Ectodérmicas (CEDE)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases
- GDB (TM) Human Genome Database
- SWISS-PROT Annotated Protein Sequence Database
- Entrez: the NCBI MEDLINE

### Créditos

Se você deseja citar este banco de dados (site) em artigos de periódicos ou publicações on-line, por favor utilize a conversão abaixo:

Lúcio-Costa T, Pagnan NAB, Freire-Maia M, Pinheiro M, Lessau R, Sorli EE. Displasias ectodérmicas (grupo A): banco de dados informatizado para auxílio ao diagnóstico genético-clínico. Centro de Estudos de Displasias Ectodérmicas (CEDE), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil), 2001.  
World Wide Web URL: <http://displasias.bio.ufpr.br/>

### Banco de imagens

**Lábio/palato fendido, oligodontia, sindactilia e alterações nos cabelos**

Lábio/palato fendido bilateral, alças prominentes, zébruas/línguas amplas, olhos longos e lábio inferior prominentemente evertido.

**Dermo-odontodisplasia**

Unhas dos dedos distroficas.

### Descritas pelo CEDE

Displasia	Símbolo	Referências
1 Síndrome odonto-odontogênica/hipodontia	1-2-3-4	NR 1968, 1970, 1972, 1980, 1990
2 Trico-displasia, onicogribose, hipertríquia e calareia	1-3-4	1 1973, 1978
3 Alopecia, onicodisplasia, hipertríquia e calareia	1-3-4	1 1976, 1977, 1981
4 Síndrome trico-odonto-onico-dermal	1-2-3	1 1988, 1981, 1990
5 Anoníquia e displasia ectodérmica	1-2-3-4	AR 1988, 1981
6 Odonto-onicodisplasia com alopecia	1-2-3	AR 1982, 1984, 1990
7 Displasia trico-odonto-oniquial	1-2-3	AR 1982, 1983
8 Dermo-odontodisplasia	1-2-3	AO 1982, 1983, 1990
9 Trico-onicodisplasia com onicodermia	2-3	AR 1982, 1984, 1990
10 Síndrome acromiária de displasia ectodérmica e de diabetes lipodérmica	1-2-3-4	AR 1982, 1983
11 Pélo seco e onicodisplasia	1-4	AO 1984, 1990
12 Lábio/palato fendido, oligodontia, sindactilia e alterações nos cabelos	1-2	AD1, AD2 1984, 1987, 1990, 1992
13 Displasia piló-odonto-oniquial com onicodermia	1-2-3	AR 1986, 1987, 1990
14 Trico-dermo displasia com alterações dentais	1-2-3	AD1, AD2 1985, 1986, 1990
15 Agenesia das pálpebras, macrostomia, retardado psicomotor, hipertríquia da testa e dente natal	1-2	1 1988
16 Culo-trico-displasia (CTD)	1-2-3	AR 1988, 1988
17 Displasia pilonária	1-3	AO 1986, 1982
18 Lábio/palato fendido, displasia ectodérmica e anomalias dos dentes	1-2-4	AR 1992
19 Displasia ectodérmica tipo Canavara	1-2-3-4	AD1, AD2 1994
20 Displasia odonto-onico hipertríquia	2-3-4	AD1, AD2 1996
21 Displasia odonto-onicodermatológica	2-3	AR 1996
22 Displasia odonto-oniquial	2-3	AO 1999
23 Trico-displasia e onicodermia	Grupo B	AO 1988, 1987, 1990

## BANCO DE IMAGENS

Para a realização do banco de imagens, foi selecionado material fotográfico pertencente ao CEDE (Centro de Estudos de Displasias Ectodérmicas).

As displasias ectodérmicas incluídas no banco de imagens foram:

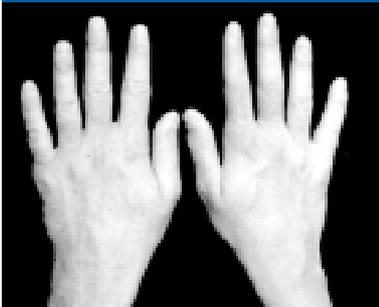
- Lábio/palato fendido, oligodontia, sindactilia e alterações nos cabelos
- Dermo-odontodisplasia

- Displasia odonto-micro-oniquial
- Síndrome trico-odonto-onico-dermal
- Agenesia das pálpebras, macrostomia, retardado psicomotor, hipertríquia da testa e dente natal
- Trico-dermo displasia com alterações dentais
- Displasia trico-odonto-oniquial
- Displasia ectodérmica hipodérmica, com hipotireoidismo e discinesia ciliar

## BANCO DE IMAGENS

### Alguns exemplos

Dermo-odontodisplasia



Unhas dos dedos distróficas

Síndrome trico-odonto-onico-dermal



Hipodontia, dentes com forma e tamanho anormais, dentes extranumerários

Displasia ectodérmica hipodrótica, com hipotireoidismo e discinesia ciliar



Alopecia na região parietal central do couro cabeludo

## BANCO DE DADOS

### (Exemplo de ficha individual de uma displasia ectodérmica)

**Subgrupo:** 1234-1

**Título:** Síndrome de Christ-Siemens-Touraine

**Sinônimos:** Displasia ectodérmica anidrótica 1; ED1; síndrome CST; displasia ectodérmica anidrótica; EDA; EDA1; displasia ectodérmica hipodrótica; HED; displasia ectodérmica hipodrótica ligada ao X; XHED; XLHED; displasia ectodérmica ligada ao sexo; displasia ectodérmica anidrótica congênita; Síndrome de Siemens-Touraine; polidisplasia ectodérmica; defeito ectodérmico congênito; síndrome da anidrose-hipotricose-anodontia; anidrose hipotricótica ligada ao sexo; displasia ectodérmica hereditária; síndrome de Jacquet; dermatose de Siemens; síndrome de Siemens; síndrome de Weech; ectodisplasia A; ectodisplasia.

**OMIM:** 305100

**BDE:** 0333

**Etiologia:** XR

**Gene:** ED1 ou EDA

**POSSUM:** 3208

**Freire-Maia e Pinheiro (1984a):** 1234-1

**Cromossomo:** Xq12-q13.1

**Proteína:** Ectodisplasia A

**Pêlos:** Finos, secos, hipocrômicos; hipotricose (couro cabeludo e corpo); sobrancelhas e cílios ausentes ou escassos; alterações estruturais (barba e bigode).

**Dentes:** Hipodontia; caninos e/ou incisivos pequenos e pontudos; persistência dos dentes decíduos; erupção tardia; anodontia ocasional.

**Unhas:** Distróficas ou ausentes no nascimento (esporadicamente); frágeis, quebradiças, com desenvolvimento incompleto e celoníquia (ocasional).

**Glândulas sudoríparas:** Hipoidrose com ou sem hipertermia; ausência ou diminuição dos poros sudoríparos dos sulcos epidérmicos; resposta reduzida à pilocarpina pela iontoforese e calor.

**Pele:** Pele fina, suave, seca; hipoplasia/ausência das glândulas sebáceas; alterações dermatoglíficas e de pigmentação (ocasionais); mamilos e aréolas ausentes; mamilos e aréolas extranumerários; região periorbital com pigmentação mais escura que o resto do corpo.

**Audição:** Perda condutiva ocasional.

**Olhos:** Fotofobia; hipoplasia dos ductos lacrimais; distrofia córnea; diminuição da função das glândulas lacrimais.

**Face:** Lábio grossos, proeminentes; ponte nasal baixa; nariz em sela; bossa frontal; hipoplasia do maxilar; rugas (abaixo e em volta dos olhos, nariz e boca); anormalidades menores no pavilhão auricular.

**Desenvolvimento psicomotor e de crescimento:** Retardo mental ocasional; estatura baixa.

**Membros:** Defeitos nas mãos e pés ocasionais.

**Outros achados:** Rinite atrófica (algumas vezes associada com ozena e epistaxe); otite média; diminuição da sensibilidade do paladar e/ou olfato; glândulas mucosas do trato respiratório superior atrofiadas (levando a um aumento na suscetibilidade a infecções); dificuldades respiratórias; faringite e laringite crônica (com disфония e rouquidão); aplasia/hipoplasia das glândulas mamárias; salivação reduzida; crosta nasal; produção anormal de imunoglobulinas; asma ou chiado recorrente; alergias específicas (comidas, remédios); problemas na alimentação.

**Comentários:** Thurnam (1848) parece ter sido o primeiro autor a descrever esta síndrome. Danz (1792) descreveu 2 homens sem pêlos e dentes, mas não deu nenhuma informação adicional sobre eles. Wedderburn é frequentemente citado como tendo descrito uma família com indivíduos afetados (origem indiana) em 1838, mas a sua descrição não apareceu na literatura até 1875, quando Darwin mencionou-a em seu livro.

**Referências bibliográficas:** Danz, 1792; Thurnam, 1848; Darwin, 1880; Freire-Maia e Pinheiro, 1984a; Buyse, 1990; POSSUM 4.0, 1994; Kupietzky e Houpt, 1995; GeneCards, 2000; OMIM, 2000; Swiss-Prot, 2000.

## Filtro clínico

### (Exemplos em um subgrupo)

#### SUBGRUPO 1-3-4

##### 1 - Sindactilia e/ou contraturas

Sim: Displasia ectodérmica com anomalias digitais e oculares  
Não: Ir para a pergunta nº 2

##### 2 - Surdez

Sim: Alopecia, oncodisplasia, hipoidrose e surdez  
Não: Ir para a pergunta nº 3

##### 3 - Estatura baixa

Sim: Ir para a pergunta nº 4  
Não: Ir para a pergunta nº 6

##### 4 - Retardo psicomotor

Sim: Ir para a pergunta nº 5  
Não: Displasia ectodérmica hipodróica, com hipotireoidismo e discinesia ciliar

##### 5 - Catarata

Sim: Tricodisplasia, onicogribose, hipoidrose e catarata  
Não: Síndrome dermatotríquica

##### 6 - Cegueira

Sim: Displasia ectodérmica com retardo mental grave  
Não: Ir para a pergunta nº 7

##### 7 - Lesões cicatriciais na língua e pele

Sim: Alopecia, atrofia da pele, anoniquia e defeitos na língua  
Não: Ir para a pergunta nº 8

##### 8 - Hipoidrose

Sim: Displasia ectodérmica e fragilidade da pele  
Não: Síndrome de Fischer-Volavsek

### Sistemas de Pesquisa

Dois sistemas de pesquisa foram disponibilizados, para proporcionar uma melhor obtenção dos dados referentes às displasias ectodérmicas pelo usuário.

#### 1. Filtro por palavra-chave

Este filtro permite a consulta ao banco de dados (que contém informações sobre as displasias ectodérmicas cadastradas), através do uso de palavra(s) chave(s). Na linguagem de consulta (como será escrito o termo para o início da pesquisa) deve-se digitar a(s) palavra(s) desejada(s) (exemplos: hipotricose, hipotricose acentuada, etc.), sem a utilização de caracteres especiais (exemplos: ", +, -, \*, etc.).

#### 2. Filtro por critério clínico

Cada afecção foi analisada individualmente, e os sinais que aparecem com frequência (responsáveis pela definição do quadro clínico da displasia) foram selecionados e posteriormente incluídos em bancos de dados específicos (para cada subgrupo). As informações fornecidas pelo usuário são confrontadas com o banco de dados escolhido, resultando na filtragem da(s) possível(is) displasia(s) ectodérmica(s).

Existem, portanto, 11 bancos de dados (de acordo com a classificação das displasias ectodérmicas).

## CONCLUSÕES

O banco de dados encontra-se disponível na Internet no endereço <http://displasias.bio.ufpr.br>. Cada afecção foi analisada individualmente, tendo sido elaborado para cada uma delas uma "ficha", com os seguintes dados: Informações gerais, aspectos genéticos, sinais clínicos clássicos, outros sinais freqüentes, comentários e referências bibliográficas utilizadas. Um banco de imagens e sistemas de pesquisa (por palavra chave e por critérios clínicos) também foram disponibilizados. Diversas outras funções foram incluídas nes-

te software (textos explicativos e tabelas, links úteis, endereço eletrônico dos responsáveis pelo projeto, créditos, etc.), visando aumentar a facilidade na obtenção das informações necessárias.

Este trabalho ampliou o número de displasias ectodérmicas conhecidas para 192 (grupo A), agrupadas em 11 subgrupos. A maioria das displasias ectodérmicas tem herança autossômica recessiva (38%), seguidas das que possuem herança autossômica dominante (28%). As displasias ligadas ao X constituem 5% e os 29% restantes incluem síndromes cuja etiologia não é conhecida. Os subgrupos com maior número de afecções são os chamados 1-2-3 e 1-2-3-4, com 48 e 40 displasias respectivamente. Seguem-se os subgrupos 1-2 com 34 afecções, o subgrupo 1-3 com 25 e o subgrupo 2-3 com 15 displasias ectodérmicas. Os demais subgrupos contêm um número inferior a 10 displasias.

## REFERÊNCIAS

1. **Advanced Pubmed Search - ENTREZ - MEDLINE.** Bethesda: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 21 dez. 2000.
2. **Buysse, M. L.** *Birth Defects Encyclopedia (BDE)*. New York: Blackwell Scientific. 1892p. 1990.
3. **Freire-Maia, N.** Ectodermal dysplasias. *Hum. Hered.* Basel, v.21, n.4, p.309-312. 1971.
4. **Freire-Maia, N.** Ectodermal dysplasias revisited. *Acta Genet. Med. Gemellol.* Rome, v.26, n.2, p.121-131. 1977.
5. **Freire-Maia, N.; Pinheiro, M.** *Ectodermal dysplasias: a clinical and genetic study*. New York: Alan R. Liss. 251p. 1984.
6. **Freire-Maia, N.; Pinheiro, M.** *Displasias ectodérmicas: manual para profissionais da área de saúde*. Curitiba: Centro de Estudos de Displasias Ectodérmicas, UFPR, 1984b.
7. **Freire-Maia, N.; Pinheiro, M.** Ectodermal dysplasias - a review of the conditions described after 1984 with an overall analysis of all the conditions belonging to this nosologic subgroup. *Rev. Bras. Genet.* Ribeirão Preto, v.10, p.403-414. 1987.
8. **Freire-Maia, N.; Pinheiro, M.** Ectodermal dysplasias - some recollections and a classification. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* New York, v.24, n.2, p.3-14. 1988.
9. **GDB™ - Human Genome Database.** The Hospital for Sick Children (Toronto, Canada) and Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 1990. Disponível em: <http://www.gdb.org>. Acesso em 21 dez. 2000.
10. **GeneCards - encyclopedia for genes, proteins and diseases.** Rehovot: Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center, 1997. Disponível em: <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards>. Acesso em 20 dez. 2000.
11. **Macromedia Inc.** Flash 5.0. San Francisco, Ca, 2000. 1 CD-ROM. Aplicativo (desenvolvimento e composição de imagens animadas).
12. **Microsoft Corporation.** Microsoft Access 2000. Redmond, Wa, 1999. 1 CD-ROM. Aplicativo (banco de dados).
13. **Microsoft Corporation.** Internet Information Server 4.0. Redmond, Wa, 1997a. 1 CD-ROM. Servidor Web.
14. **Microsoft Corporation.** Microsoft Windows NT Server 4.0. Redmond, Wa, 1997b. 1 CD-ROM. Ambiente operacional.
15. **OMIM™.** *Online mendelian inheritance in man*. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em 19 dez. 2000.
16. **Pagnan, N. A. B.** *Estudo genético-clínico de síndromes com camptodactilia*. São Paulo, 1988. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
17. **Pinheiro, M.; Freire-Maia, N.** Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *Am. J. Med. Genet.* New York, v.53, n.2, p.153-162. 1994.
18. **Pinheiro, M.; Freire-Maia, N.** Ectodermal dysplasias. In: **Harper, J. I. (Ed).** *Inherited skin diseases: the genodermatoses*. London: Butterworths/Heinemann. p.126-144. 1996.
19. **POSSUM (Pictures of Standard Syndromes and Undiagnosed Malformations).** Version 4.0. Melbourne: The Murdoch Institute for Research into Birth Defects Royal Children's Hospital, 1994. 2 disquetes.
20. **Solomon, L. M.; Cook, B.; Klipfel, W.** The ectodermal dysplasias. *Dermatol. Clin.* Philadelphia, v.5, n.1, p.231-237. 1987.
21. **Solomon, L. M.; Keuer, E. J.** The ectodermal dysplasias. Problems of classification and some newer syndromes. *Arch. Dermatol.* Chicago, v.116, p.1295-1299. 1980.
22. **SWISS-PROT annotated protein sequence database.** Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics. Cambridge: EMBL Outstation - The European Bioinformatics Institute, 1986. Disponível em: <http://www.expasy.ch/sprot>. Acesso em 19 dez. 2000.

Endereço para correspondência

Dr. Toni Lisboa Costa

Rua General Osório, 3212 - Centro - 85807-470 - Cascavel, PR

E-mail: [tlisboa@uol.com.br](mailto:tlisboa@uol.com.br)

# Efeito de *Monascus* sobre os constituintes sanguíneos em coelhos

## *Monascus* effects in rabbit's blood serum constituents

T. T. de Oliveira<sup>1</sup>; T. J. Nagem<sup>2</sup>; R. M. Lopes<sup>1</sup>; G. H. K. Moraes<sup>1</sup>; R. R. da Silva<sup>1</sup> & M. R. da Costa<sup>1</sup>

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes dosagens de *monascus* sobre os constituintes sanguíneos, em coelhos da raça Nova Zelândia, com 55 dias de vida para verificar o seu efeito hipolipidêmico e sua inocuidade nos parâmetros sanguíneos. Os resultados evidenciaram uma redução nos níveis de colesterol total nas fêmeas e um aumento nos triacilgliceróis, na dose de 100 mg da substância. Os níveis de albumina e creatinina, mostraram alterações estatisticamente significativas em todos os grupos e tempos considerados, mas nenhuma alteração foi observada nos valores médios de uréia e glicose, proteína sérica, cálcio e HDL-colesterol. Os resultados encontrados para bilirrubina total não indicaram efeito toxicológico das substâncias testadas. Os níveis de Gama-GT aumentou para a dose de 100 mg de *monascus* nas fêmeas e permaneceram inalterados nos coelhos machos. O aumento dos níveis de cloro podem ser consideradas irrelevantes. As fêmeas que receberam 40 mg de *monascus* apresentaram níveis aumentados de TGP, sendo que níveis séricos de fósforo não apresentaram flutuações.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Monascus*, toxicologia, coelhos.

**SUMMARY** – The aim of this study was to test the effect of different doses of *monascus*, in rabbits, in order to verify hypolipidaemic effects in the blood serum parameters. The results showed a reduction of total cholesterol in the females and an increase of the triacilgliceróis, in the dose of 100 mg of *monascus*. The albumin and creatinin levels, showed statistically significant alterations in all the groups and times, but no alteration was observed in the medium values of uréia and glycose, serum protein calcium and HDL-cholesterol. The results found for total bilirubin did not showed toxicological effect of the *monascus*. The gama GT levels increased for the dose of 100mg of *monascus* in the females and was unaffected for male rabbits. The increase of chlorine level can be considered not important. The females that received 40mg of *monascus* showed increase of TGP levels but not for serum phosphorus.

**KEYWORDS** – *Monascus*, toxicology, rabbits.

## INTRODUÇÃO

Os povos asiáticos usam o produto da fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus* (*Monascus pilosus*, *Monascus purpureus*, e *Monascus ruber*), como corante e condimento na produção de alimentos, especialmente para a coloração de carnes, peixes, aves (Fink-Gremmels &, Leitsner, 1989).

Esta fermentação produz uma massa vermelha, usada na forma de pó como corante (Francis, 1987) além de grande quantidade de enzimas hidrolíticas: amilase, glicoamilase, protease e lipase, etc., e pigmentos vermelhos, amarelos e purpúreos, que incluem: monascorubrina, rubropunctamina, rubropunctatina, monascina, ankaflavina, e monascorubramina (Wong & Koehler, 1989).

O principal composto com atividade antibacteriana produzido por *Monascus purpureus*, é a monascidina A, (Blanc *et al.*, 1995).

A atividade antibacteriana foi testada em carnes substituindo nitrito e nitrato (Fink-Gremmels *et al.*,

(1991). Este apresentou ação inibitória para *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (Fink-Gremmels *et al.*, 1991). Esses autores haviam pesquisado antes a ação dos pigmentos de *Monascus purpureus* solúveis em metanol (extrato de angkak), quanto a toxicidade e efeito anticolesterolêmico em ratos. Foram observados que os animais hiperlipidêmicos tiveram redução nos níveis de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis plasmáticos sem efeitos tóxicos nas doses de 5 e 10g/kg de peso corporal do extrato de pigmento (Fink-Gremmels &, Leitsner, 1989).

Por outro lado, monacolina K (mevinolina), um composto que não apresenta um anel tetrahidrofurânico mostrou ação hipocolesterolêmica, que especificamente inibe a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase Endo *et al.* (1985). A monacolina K foi isolada a partir dos fungos *Monascus ruber* e *Aspergillus terreus*, não sendo produzida pelo *Monascus purpureus* (Fink-Gremmels &, Leitsner, 1989).

Recebido em 3/10/2002

Aprovado em 15/10/2002

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Extratos metanólicos de arroz fermentado por *Monascus purpureus* in vitro apresentaram mutagênese com testes em Salmonella (Jahn, 1991). Outros testes envolvendo genotoxicidade e mutagenicidade foram feitos (Fink-Gremmels *et al.*, 1991) tendo seus resultados sido inferiores aos dos compostos nitrosos formados em carnes curadas. Isto levou esses autores a concluir que extratos de *Monascus* podem ser uma alternativa para substituição de nitritos em carnes (Fink-Gremmels *et al.*, 1991)

## MATERIAL E MÉTODOS

Nesse experimento foram utilizados 40 coelhos da raça Nova Zelândia, com 55 dias de idade, sendo os grupos formados por metade machos e metade fêmeas. Todos os animais foram provenientes do setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa. *Monascus* nas doses de 40, 80 e 100 mg foram administrados oralmente, na forma de cápsulas. Os animais foram dispostos em gaiolas individuais conforme descrição abaixo e a temperatura local do ensaio foi  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ . A taxa de umidade relativa do ar era em torno de 70%.

- Grupo 1- Ração
- Grupo 2- Ração + *monascus* (40mg)
- Grupo 3- Ração + *monascus* (80mg)
- Grupo 4- Ração + *monascus* (100mg)

O regime alimentar se constituiu de água potável *ad libitum* e ração comercial marca Socil. Foram fornecidos uma quantidade de 120g/dia por animal. Após um período de adaptação de sete dias às condições locais do experimento foi administrada a substância teste e os animais receberam as substâncias teste, com suas respectivas doses, durante 28 dias. Cada animal recebeu uma cápsula diariamente às 9 horas da manhã. Após o vigésimo oitavo dia, esperou-se 24 horas para a coleta de sangue dos animais que estavam em jejum. O sangue foi coletado pelo plexo venoso retro-orbital de cada animal, centrifugado à 7100 x g durante 15 minutos. As dosagens sorológicas foram efetuadas em equipamento de dosagens multiparamétrico

de Bioquímica (Alizé), sendo realizadas as seguintes análises: colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, albumina, proteínas totais, creatinina, uréia, ácido úrico, bilirrubina direta, bilirrubina total, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama-glutamil-transferase, cálcio, fósforo, cloro, glicose utilizando-se kits da marca Biomérieux.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que constituintes bioquímicos, quando alterados, podem indicar estados patológicos e lesões em órgãos importantes para o bom funcionamento do organismo, tais como: fígado, rins, pâncreas, dentre outros. Desta forma, estudos bioquímicos de constituintes como cloretos, fósforo, cálcio, bilirrubina, creatinina e uréia são bons indicadores de possíveis efeitos toxicológicos de medicamentos ou outras substâncias em nível histológico.

A análise da Figura 1 mostram ganho de peso de 636,75 g para machos e de 622,20 para fêmeas.

A Figura 2 mostra que os grupos de machos não variaram os seus valores médios de colesterol total, mantendo os seus níveis séricos de colesterol em 64,53 mg/dL. Observou-se que os níveis de colesterol foram reduzidos em todas as fêmeas dos grupos tratados, evidenciando-se uma capacidade hipocolesterolêmica nestes animais, embora nos machos não foi observado o mesmo efeito.

Em fêmeas, após o tratamento com 100 mg de *monascus* houve uma elevação no colesterol total dos animais para 166,97 mg/dL enquanto doses estimativas de 38,10 mg do corante reduziria o constituinte para 113,94 mg/dL.

A análise da Figura 3 mostra que os machos e as fêmeas não apresentaram alterações significativas de colesterol-HDL, quando se comparou os tempos 0 e 28 dias.

Os níveis séricos de triacilgliceróis em machos tratados com *monascus* encontram-se registrados na Figura 4 e apresentaram manutenção em suas médias nas doses testadas. Verifica-se que *monascus* em sua

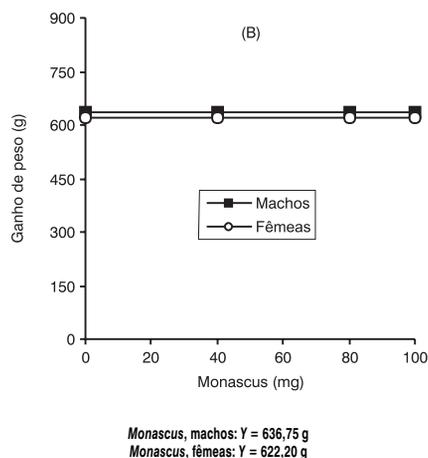


FIG. 1 - Estimativa do ganho de peso de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses *monascus*.

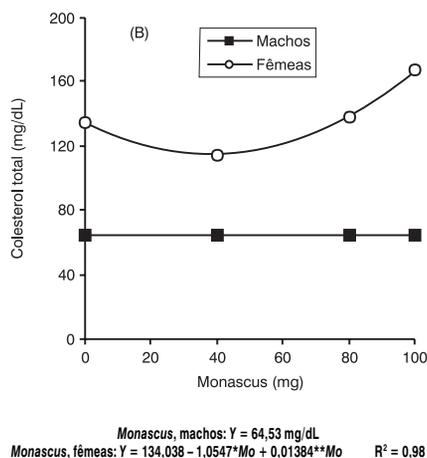


FIG. 2 - Estimativa do colesterol total de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

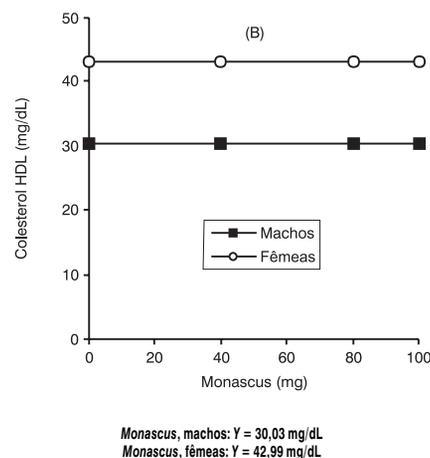


FIG. 3 - Estimativa do colesterol HDL de coelhos machos e fêmeas avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

maior dose aplicada em fêmeas (100 mg) elevou o triacilglicerol em 147,00mg/dL. Estima-se que 35,33 mg do corante reduz de forma significativa tais níveis para 97,99 mg/dL.

A Figura 5 mostra que machos tratados com 80 mg do corante *monascus* apresentaram variações estatisticamente significativas quando considerados os tempos inicial e final com um aumento de 4,50 para 4,81 mg/dL.

É fato conhecido que proteínas séricas em coelhos adultos são similares aos de outras espécies, e que quantidades relativas de albumina compreendem 40-60% das proteínas (Bortolotti *et al.* 1989).

O fígado é o principal órgão de produção da albumina, sendo esta uma molécula transportadora no sangue de medicamentos, nutrientes, e outros constituintes químicos. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação. A redução dos níveis, entretanto, é observada em várias situações, como na síndrome nefrótica pela perda maciça do constituinte pelos rins e a diminuição da capacidade de síntese pelo organismo (Lima, *et al.* 1985).

Verificam-se valores nos animais empregados no grupo controle de 4,65 mg/dL em machos e 4,33 mg/dL em fêmeas, no tempo zero dos experimentos.

Correlacionando-se os resultados obtidos expressos na Figura 5 com o fato da redução de albumina estar associada com doenças renais e hepáticas, conclui-se que *monascus* não interferiu sobre os órgãos responsáveis pelo metabolismo do constituinte. Ele não atuou significativamente no aumento do constituinte em machos e o tratamento com 100 mg a elevou para 4,76 mg/dL. Sabendo que o valor médio do grupo controle foi de 4,54 mg/dL e nas fêmeas foi de 4,48 mg/dL.

Com relação à creatinina (Figura 6), os animais do mesmo sexo e dentro do mesmo grupo nos tempos 0 e 28 dias, apresentaram variações estatisticamente significativas somente nos machos que receberam ração e ração + 100 mg de *monascus*. Já as fêmeas apresentaram variações dentro dos grupos que consumiram ração + 40 mg de *monascus*, e, no final do experimento todos os grupos aumentaram as suas concentrações.

Considerando-se que os valores normais de creati-

nina para machos foram de 1,18 mg/dL e para fêmeas de 1,24 mg/dL, as variações observadas foram relativamente baixas.

A creatinina se forma do ácido fosfórico da fosfocreatina muscular, a partir de reações dos aminoácidos arginina e glicina, sendo, portanto, um produto endógeno do catabolismo da creatina a nível muscular. É eliminada pelos rins em quantidade singularmente constantes, através da filtração glomerular em excreção tubular ativa. Seus valores independem da ingestão de proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário (Lima *et al.*, 1985).

Elevações dos níveis séricos de creatinina no sangue ocorre por insuficiência renal, na nefrite incipiente, na glomerulonefrite crônica, obstruções urinárias, por afecções da próstata, bexiga ou ureter, bem como na oligúria reflexa provocada pela nefrolitíase (Lima *et al.*, 1985).

*Monascus* em doses de 53,31 mg acarretariam num aumento para 1,47 mg/dL de creatinina e o grupo controle apresentou valores médios de 1,24 mg/dL. Estima-se que a menor média calculada de 1,17 mg/dL se apresentaria em um tratamento com 38,27 mg do corante.

Apenas fêmeas tratadas com ração apresentaram variações estatisticamente significativas, quando comparamos os tempos inicial e final do experimento.

Em relação à uréia (Figura 7) observou-se que os valores normais nos coelhos foram de 27,52 mg/dL para machos e 28,54 mg/dL em fêmeas.

Mitruka & Raw, 1981, citam que as variações normais de uréia em coelhos se encontram numa faixa semelhante àquelas encontradas em um homem, por isso os resultados não apresentaram efeito toxicológico nas doses administradas, já que os valores médios de uréia em coelhos machos, após administração de *Monascus* manteve-se constante em 29,66mg/dL. A dose diária de 100mg do corante em fêmeas elevaram o nível da uréia para um valor médio de 34,40mg/dL, ainda dentro da faixa de normalidade em comparação com o grupo controle que apresentou a menor média de 28,77mg/dL.

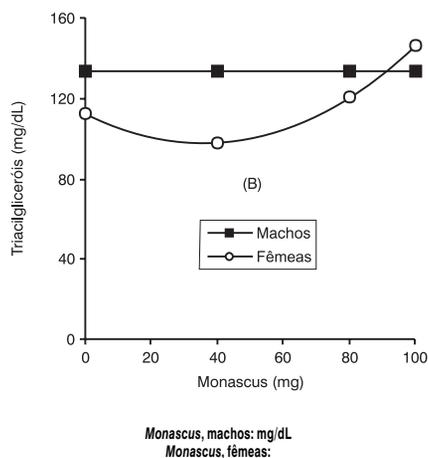


FIG. 4 - Estimativa do triacilglicerol de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

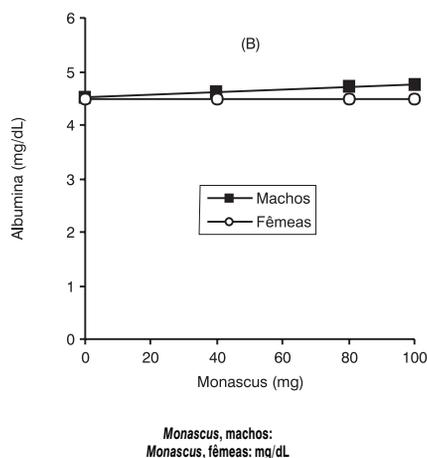


FIG. 5 - Estimativa da albumina de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

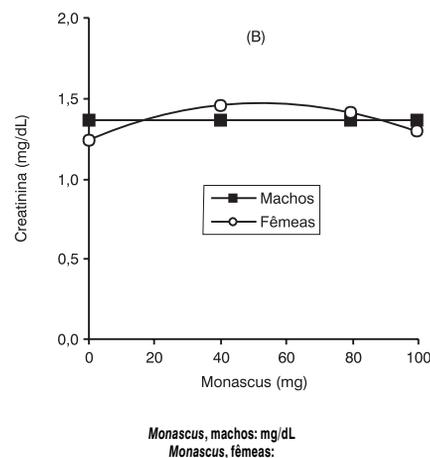


FIG. 6 - Estimativa da creatinina de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

Coelhos eliminam amônia como principal forma de excreção nitrogenada. Entretanto, nos mamíferos em geral, a uréia é o principal produto final do metabolismo das proteínas, sendo responsável pela excreção de 80% do nitrogênio não protéico excretado pela urina (Lima *et al.*, 1985). A dosagem sérica de uréia é comumente utilizada para se avaliar as funções renais.

O aumento no teor de uréia no sangue pode ser devido a redução da eliminação renal, aumento do catabolismo de proteínas ou combinação desses dois processos (Lima *et al.*, 1985). ou também a causas patológicas como choques traumáticos, choques hemorrágicos, desidratação aguda ou perda de eletrólitos, descompensação cardíaca, infecção aguda, toxemia, e catabolismo protéico aumentado bem como na glomerulonefrite (Ragan, 1989).

Já a redução de uréia sangüínea são causadas por esteróides anabólicos, diminuição da ingestão protéica na dieta e na insuficiência hepática aguda (Ragan, 1989).

Para ácido úrico (Figura 8) foram encontradas variações estísticamente significativas quando comparados machos e fêmeas em todos os grupos e tempos, nos tratamentos com ração + 80 mg de *monascus* aos 28 dias.

Pela baixa variação encontrada nos coelhos em todos os grupos do ensaio, verificou-se que o *monascus* não interferiu no metabolismo deste constituinte bioquímico.

Fêmeas que receberam diferentes doses de *monascus* também não alteraram o referido constituinte, quando comparadas com o grupo controle permanecendo com médias de 0,12mg/dL. Variações neste parâmetro só foi verificado em machos, nos quais a menor média estimada (0,13mg/dL) foi calculada no tratamento situado entre o grupo controle até 40mg e a maior (0,22mg/dL) foi encontrada no tratamento com a dose de 80mg do corante. Observou-se que ocorreu uma redução progressiva dos níveis séricos de ácido úrico em machos, quando foi analisado o intervalo entre as doses diárias de *monascus* de 80 a 100mg (Figura 8).

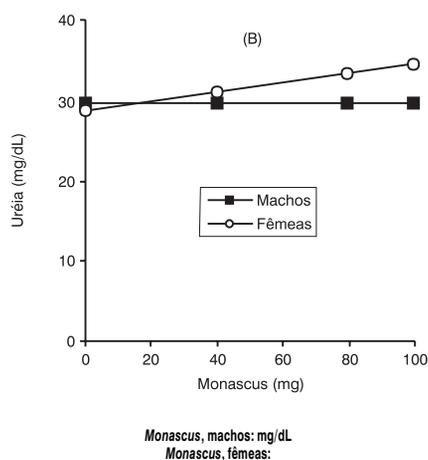


FIG. 7 - Estimativa da uréia de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

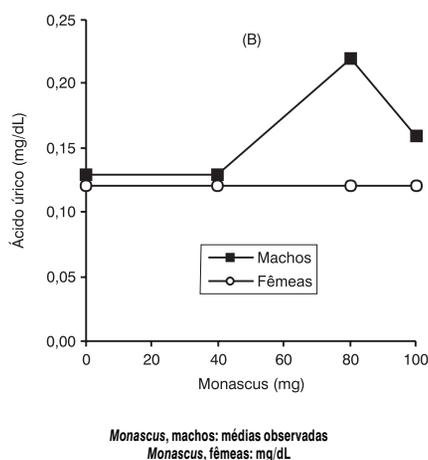


FIG. 8 - Estimativa do ácido úrico de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

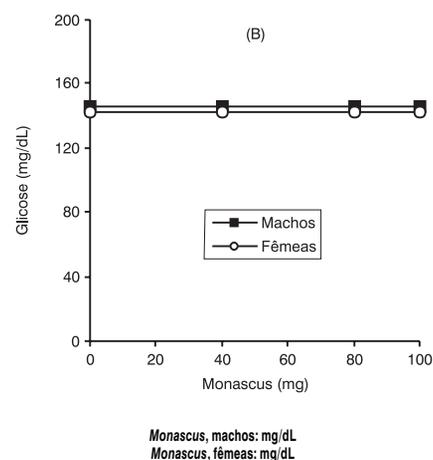


FIG. 9 - Estimativa da glicose de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

O ácido úrico é o principal metabólito das purinas no organismo humano. Elevação desse pode ocorrer em todas as formas de insuficiência renal, obstrução do trato renal, lesões renais, hipogenesia dos rins, insuficiência cardíaca congênita, no hipotireoidismo, na hipertensão, na quimioterapia de tumores malignos, na psoríase, no jejum prolongado e no hiperparatireoidismo (Lima *et al.*, 1985).

A Figura 9 apresenta as alterações que ocorreram nos níveis séricos de glicose e que não foram estatisticamente significativos em todos os grupos e tempos do ensaio biológico.

Os níveis de glicose não sofreram alterações pelo tratamento com as substâncias-teste. Machos tratados com *monascus* em suas diferentes doses mantiveram o mesmo valor de glicose que o grupo controle (145,86mg/dL).

Fêmeas tratadas com *monascus* em todos os grupos mantiveram a média encontrada no grupo controle, ou seja, 142, 55mg/dL (Figura 9).

O metabolismo de carboidratos é freqüentemente mensurado através da determinação da glicose sérica. Dentre os fatores que afetam os níveis normais de glicose em coelhos estão os distúrbios hereditários (Kozma *et al.* 1974), idade, hipotermia, medicamentos e dieta (Pegórier *et al.*, 1987). Os resultados indicam uma ausência de toxicidade do *monascus* sobre o metabolismo de carboidratos nos coelhos nas doses empregadas.

A glicose é o único carboidrato circulante no sangue, outros monossacarídeos podem transitoriamente ser encontrados no sangue, após a alimentação, mas são prontamente convertidas à glicose no fígado.

A glicemia se eleva depois da ingestão de alimentos, seu nível atinge cerca de 160mg/dL, dentro de um intervalo médio de uma hora em uma pessoa normal. Transposto este nível (limiar renal) a glicose é excretada na urina, indicando uma condição patológica (Lima *et al.*, 1985).

O controle glicêmico ocorre pela interação de diversos hormônios, destacando-se a insulina produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas (atuando na redução da taxa glicêmica). O

glucagon produzido pelas células alfa das mesmas ilhotas, a epinefrina, a norepinefrina, os glicocorticóides, o ACTH e o hormônio do crescimento atuam na elevação da glicemia. Patologicamente, altos níveis de glicose são encontrados nos casos de diabetes mellitus.

Os valores normais de glicose no início do experimento no grupo controle foi de 139,14mg/dL para machos e de 137,62mg/dL em fêmeas.

Considerando-se que a dieta de coelhos é constituída de 80% de carboidratos e seu metabolismo é intenso para esta classe de compostos, o resultado observado demonstrou baixo potencial toxicológico do *monascus* nas doses empregadas.

A Figura 10, referente ao tratamento realizado com *monascus*, mostra diferenças entre os níveis do constituinte em machos e fêmeas. A análise gráfica indica que a bilirrubina reduziu no soro da menor para a maior dose em animais machos: 0,35mg/dL no grupo controle e 0,26mg/dL no tratamento diário com 10mg do corante.

As fêmeas que ingeriram diariamente 80mg de *monascus* demonstraram a maior estimativa média de nível sérico da bilirrubina (0,38mg/dL), e o grupo que ingeria 40mg diminui seus níveis para 0,27mg/dL.

Os resultados apresentados para bilirrubina total e direta não demonstraram efeitos tóxicos para as substâncias testadas. As diferenças estatisticamente significativas encontradas, a nível fisiológico, não indicam que o corante tenham causado patologias hepáticas.

Os valores normais das dosagens sorológicas de bilirrubina direta em coelhos machos e fêmeas foi de 0,03mg/dL (Figura 10). A origem da bilirrubina ocorre a partir da destruição fisiológica de hemácias envelhecidas localizadas no sistema reticuloendotelial, à custa da hemoglobina. Bilirrubina é transportada ao fígado onde é conjugada pela glicuronil transferase e secretada na bile. Muñoz *et al.* 1974, sugere que a glicose exógena modifica o processo de conjugação hepática da bilirrubina.

Aumento dos níveis séricos de bilirrubina ocorrem na icterícia obstrutiva e hepatocelular; hepatite virótica, cirrose e necrose hepática; tumores hepáticos; intoxicações por éter, clorofórmio e tetracloreto de car-

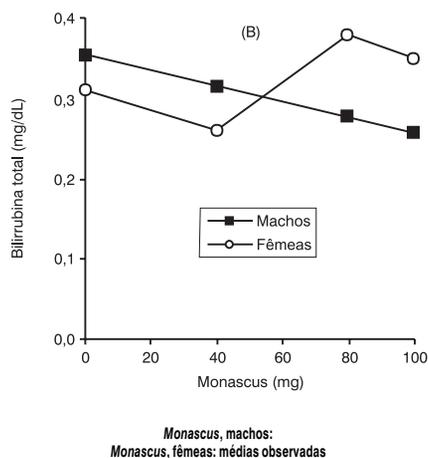


FIG. 10 - Estimativa da bilirrubina total de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de *monascus*.

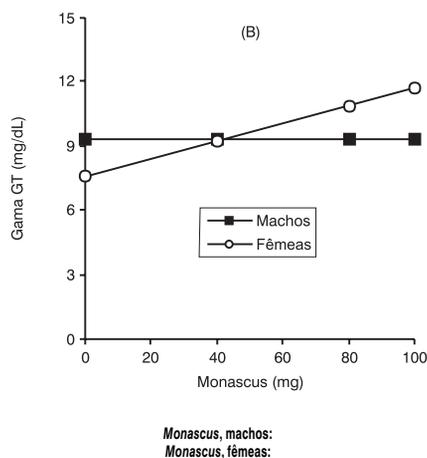


FIG. 11 - Estimativa do gama-GT de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

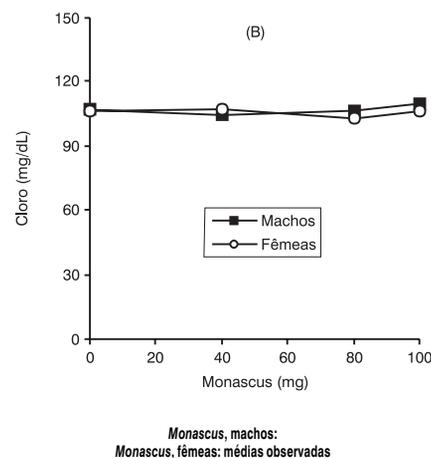


FIG. 12 - Estimativa do cloro de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses *monascus*.

bono; anemia hemolítica, malária e envenenamento por cogumelos ou mordidas de ofídeos (Lima *et al.* 1985).

Machos quando tratados com *monascus* permaneceram com seu nível médio de Gama-GT em 9,35 UI em todos os grupos. Entretanto, quando consideramos o estudo sobre as fêmeas, verificou-se que a dose de 100mg do corante natural aumentou a média dos níveis do constituinte (11,75 UI), sendo que o grupo controle demonstrou a menor média (7,64 UI).

É importante ressaltar que ao se observar a Figura 11, verifica-se que *monascus* agiu de forma antagônica sobre os níveis séricos de Gama-GT sobre as fêmeas.

A gama glutamil transferase catalisa a conjugação de aminoácidos com a gama cisteinil glicina, produzindo gama-glutamil aminoácido e cisteinil glicina que resulta na transferência do resíduo de glutamil do glutatión para o aminoácido que está penetrando no citoplasma celular. Esta reação é um exemplo de translocação de grupo no qual o substrato transportado aparece em uma forma química diferente dentro da célula. Todo este processo representa uma forma de entrada de aminoácidos para o interior das células (Lehninger *et al.* 1995).

Pode-se estimar que uma alteração acentuada nos níveis normais da gama glutamil transferase poderia afetar a entrada de aminoácidos a nível celular. Desta forma, poderia haver alterações da síntese protéica a nível de retículo endoplasmático rugoso e, ou, polirribossomos. Entretanto, os dados obtidos indicam que as dosagens encontradas nos tratamentos com *monascus* não apresentaram alterações na atividade dessa enzima consideradas tóxicas.

O corante *monascus* alterou os níveis sanguíneos de cloro nos animais (Fig. 12). A maior média estimativa em machos foi obtida em animais cujo tratamento foi de 100 mg por dia (109,45mg/dL), sendo que o menor valor médio encontrado seria de 104,83mg/dL, correlacionado o mesmo com uma dose calculada diária de 42,47mg de *monascus* ao longo de 28 dias.

A diminuição de cloro no sangue pode ser detectada na diabetes grave com acidose, nos estados febris,

nos distúrbios gastrointestinais, na sudorese abundante, na insuficiência renal e pancreatite aguda (Lima *et al.* 1985). Segundo o mesmo autor, a hiperclorêmia, apesar de ser mais rara, pode ocorrer nos estados de nefrose, hipertensão, pela administração excessiva de solução fisiológica nos pós-operatório e na anemia.

Fêmeas tratadas com o corante em doses de 80mg, apresentaram valores médios de cloro de 106,12mg/dL, (menor estimativa encontrada). O valor máximo do constituinte foi de 107,24mg/dL, obtido em animais submetidos a doses de 40mg diária do composto estudado.

Os valores normais de cloro para coelhos machos e fêmeas foram de 103,60mg/dL e 103,58mg/dL, respectivamente.

Conclui-se que as variações nos níveis de cloro encontradas nos animais submetidos ao tratamento de *monascus* podem ser consideradas irrelevantes, uma vez que os valores médios obtidos dos níveis sorológicos de cloro pouco se diferenciam dos grupos controle.

Os níveis séricos de proteínas em machos que ingeriram *monascus* não sofreram modificações em suas médias, permanecendo em todos os grupos no valor de 69,45mg/dL (Figura 13), não sendo observado resultado em fêmeas, em que a maior dose do corante influenciou na elevação máxima de proteínas para 70,57mg/dL. O grupo controle obteve a menor estimativa calculada: mantendo-se com o valor médio em 64,83mg/dL.

Segundo Bortolotti *et al.* (1989), os níveis normais de proteínas totais em coelhos adultos varia entre 60 e 70g/L. Considerando-se que nas amostras realizada no tempo final (28 dias), os animais estavam com aproximadamente 85 dias, a média apresentada em todos os grupos tratados se encontravam em níveis normais. Conseqüentemente, estima-se que não houve efeitos tóxicos da substância-teste nas doses assimiladas pelos animais.

As reduções nos níveis de albumina e proteína totais podem se associar com lesões hepáticas e renais. Proteínas totais podem apresentar valores acima do normal em desidratações e hipotermia.

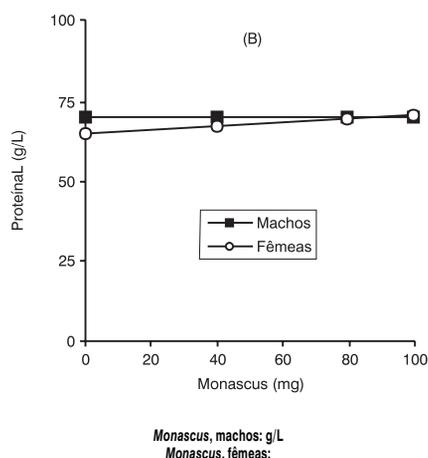


FIG. 13 - Estimativa da proteína de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de *monascus*.

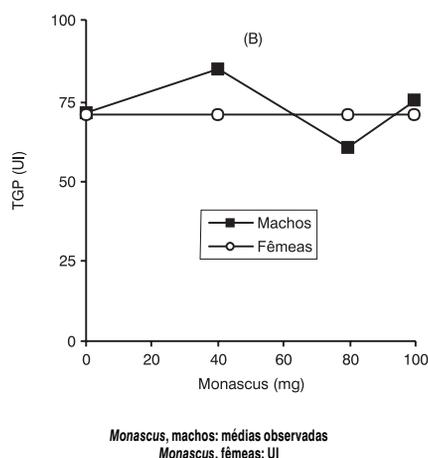


FIG. 14 - Estimativa do TGP de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.

A Figura 14 mostra a estimativa da TGP nos animais avaliados e demonstra que nos machos a dose de 80mg de *monascus* apresentou uma diminuição estatisticamente significativa e na dose de 40mg uma elevação também estatisticamente significativa. As fêmeas tratadas com *monascus* não sofreram variações de TGP no soro,

Quarenta miligramas de *monascus* aumentou o valor desta transaminase para 84,80 UI, enquanto que o dobro da dose em questão (80mg) diminuiu para a menor estimativa calculada, ou seja, um valor de 60 UI. Valores médios de 70,23 UI foram calculados para todos os grupos de tratamentos.

Alanina aminotransferase também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) catalisa a reação ácido pirúvico + ácido glutâmico « alanina + ácido alfa-cetoglutarico. TGP é considerada específica para o fígado e seus níveis plasmáticos servem como bons indicadores de injúrias hepáticas. Entretanto, em coelhos, existem altas concentrações de TGP no músculo cardíaco (Hoffmann *et al.*, 1989).

A Figura 15 indica que os níveis séricos de fósforo em fêmeas tratadas com *monascus*, de acordo com a dose empregada, não mostraram flutuações nos valores médios do constituinte bioquímico analisado (7,11mg/dL). Para indivíduos machos a maior média encontrada foi de 8,49mg/dL no grupo de 80mg e a menor de 7,11mg/dL encontrada no grupo de animais que ingeriram 40mg/dia da substância testada. Observando que os valores normais de fósforo em machos foram de 7,37mg/dL e em fêmeas de 7,29mg/dL, os resultados apresentados não demonstraram toxicidade do *Monascus* sobre os níveis sanguíneos de fósforo.

O fósforo sérico existe principalmente na forma de fosfato sendo que esses níveis são controlados pela vitamina D, níveis de calcitonina e paratormônio, dieta, balanço ácido-base, e níveis de íons cálcio.

Hiperfosfatemia é verificada na hipervitaminose D, insuficiência renal crônica, hipoparatiroidismo, osteoporose, carcinomas osteolística metastática e acidose láctica.

A Figura 16 mostra que não houve alterações esta-

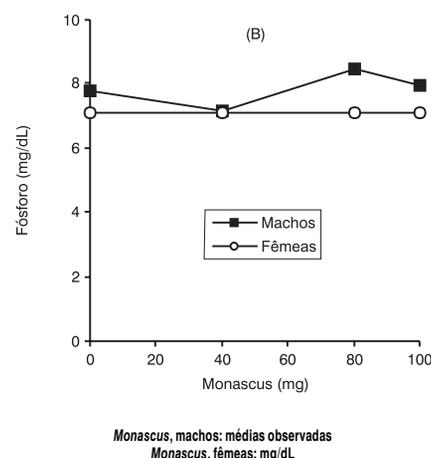
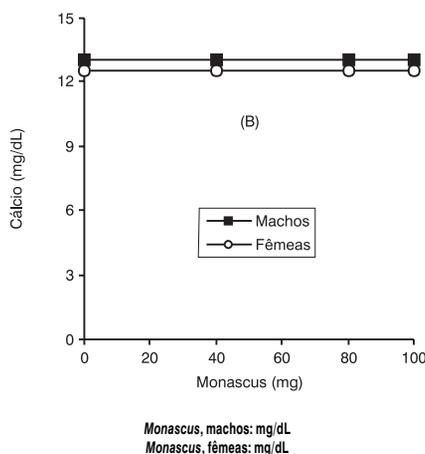


FIG. 15 - Estimativa do teor de fósforo de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.



**FIG. 16 - Estimativa do teor de cálcio de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de *monascus*.**

tisticamente significativas de cálcio quando comparados machos e fêmeas. Observou-se que dentro de um mesmo grupo, os machos tratados com 80mg do corante mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Entretanto essas alterações não apresentam significância fisiológica uma vez que as demais doses empregadas não mostraram variações significativas. Os valores de cálcio do grupo controle, nos tempos inicial e final, se situaram numa faixa próxima dos resultados obtidos em todos os grupos de animais que foram submetidos aos tratamentos, ou seja, uma concentração média de 11,30mg/dL para machos e uma média de 11,90mg/dL para fêmeas, ambas no tempo zero. Estimativas de 13,08mg/dL de cálcio para machos e de 12,56mg/dL para fêmeas foram obtidos quando calculados para *monascus*.

O cálcio em coelhos é absorvido no intestino delgado. Dietas ricas em cálcio acarretam liberação de urina rica em carbonato de cálcio, sendo a excreção de cálcio pela urina do coelho um fator que demonstra a ausência de controle homeostático dos níveis de cálcio no soro (Hoffmann *et al.*, 1989).

Segundo Cheeke, (1987), as diferenças existentes entre o coelho e a maioria dos animais com relação ao metabolismo do cálcio pode ser resumida nos seguintes aspectos:

a) o animal tem uma alta taxa de absorção de cálcio, que não está regulada com as necessidades metabólicas de utilização deste componente; o que explica os valores de cálcio nos coelhos acima do encontrado na espécie humana;

b) os níveis de cálcio no sangue não estão regulados homeostaticamente e sim guardam relação direta com a concentração de cálcio presente na dieta;

c) A fração ultrafiltrável do cálcio presente no sangue é elevada, determinando uma passagem acentuada do constituinte ao rim; d) A principal rota de excreção de cálcio nos coelhos é a urina, o que os diferencia dos outros animais, cuja principal rota de eliminação se dá pela bile.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que as fêmeas

apresentaram aumento nos níveis de TGP para a dose de 40mg de *monascus* e de gama GT para a dose de 100 mg. Os demais parâmetros sendo alterados demonstram falta de toxicidade de *monascus* sobre os parâmetros bioquímicos do sangue.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao CNPq, pelas bolsas de produtividade de pesquisa concedidas aos dois primeiros autores.

## REFERÊNCIAS

1. Blanc, P. J.; Laussac, J. P.; Le Bars, P.; Loret, M. O.; Pairelleux, A.; Prome, D.; Prome, J. C.; Santerre, A. L.; Goma, G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* v.27, p.201-213, 1995.
2. Bortolotti, A.; Castelli, D.; Bonati, M. Hematology and some chemistry values of adult, pregnant and newborn New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim. Sci.* v.39, p.437-439, 1989.
3. Cheeke, P. R. *Alimentación y nutrición del conejo*. Editora Acríbia, S.A., 429p. 1995.
4. Endo, A.; Hasumi, K.; Negishi, S. Monacolins J and L new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J. Antibiot.* Tokyo, v.38, n.3, p.420-422, 1985.
5. Fink-Gremmels, J.; Henning, A.; Leitsner, L. Studies on cytotoxicity and genotoxicity of a *Monascus* extract. *Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.* n.111, p.38-44, 1991.
6. Fink-Gremmels, J.; Leitsner, L. Biological effects of *Monascus purpureus*. *Fleischwirtsch.* v.69, n.1, p.115-122, 1989.
7. Francis, F. J. Lesser-known food colorants. *Food. Technol.* Chicago, p.62-68, 1987.
8. Hoffmann, W. E.; Krammer, J.; Main A. R.; Torres, J. L. Clinical Enzymology. In: Loeb, W. F.; Quimby, F. W. (Eds.) *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. New York: Pergamon, p.237-278. 1989.
9. Jahn, A. Evaluation of genotoxicity of a *Monascus* extract by three in vitro tests. *Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.*, Bonn, n.114, p.379-387, 1991.
10. Kozma, C.; Macklin, W.; Cummins, L. M.; Mauer, R. The anatomy, physiology and biochemistry of the rabbits. In: Weisbroth, S. H.; Flatt, R. E.; Kraus, A. L. (Eds.) *The biology of the Laboratory Rabbit*. New York: Academy Press, p.50-72. 1974.
11. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 839p. 1995.
12. Lima, A. O.; Soares, B. J.; Greco, J. B.; Gallizi, Cançado, J. R. *Métodos de laboratório aplicados a técnicas e interpretação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed. 382p. 1985.
13. Mello, H. V.; Silva, J. F. *A criação de coelhos*. 2ª ed. Editora Globo, 214p. 1989.
14. Mitruka, B. M.; Rawnsley, H. M. *Clinical biochemical and hematological references value in normal experimental animals and normal humans*. 2ª ed. New York: Masson, 1981.
15. Munõz, M. E.; González, J.; Esteller, A. Bile pigment formation and excretion in the rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.* v.85, p.67-71, 1986.
16. Pégorier, J. P.; Duée, P. H.; Girard, J. R. Contribution of hepatic fatty acid oxidation and exogenous galactose supply to regulation of glucose homeostasis in the newborn rabbit. *Biol. Neonate.* v.51, p.31-39. 1987.
17. Ragan, H. A. Markers of renal function and injury. In: Loeb, W. F., Quimby, F. W. (Eds.) *The clinical chemistry of laboratory animals*. New York: Pergamon, p.321-344. 1989.
18. Wong, H. C.; Koehler, P. E. Production of red water soluble *Monascus* pigments. *J. Food Sci.* Chicago, v.48, p.1200-1203, 1989.

Endereço para correspondência

Prof. Tanus Jorge Nagem

Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Universidade Federal de Ouro Preto - 35400-000- Ouro Preto - Minas Gerais

E-mail: tjnagem.bh@zaz.com.br

# O antígeno prostático específico e sua importância na decisão clínica no câncer de próstata

## The prostatic specific antigen and its importance in the clinical decision in the prostate cancer

Anelise S. Marchesan<sup>1</sup>; Alan A. Azambuja<sup>2</sup>; Patrick Gaspareto<sup>3</sup>; Márcio de Assis<sup>3</sup>; Melissa Guerra Simões Pires<sup>4</sup> & Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>5</sup>

**RESUMO** – O câncer de próstata (CaP) representa um problema de saúde pública de proporções cada vez mais importantes. É uma das neoplasias mais frequentes nos homens e representa uma das principais causas de morte na população. A busca de métodos diagnósticos para as neoplasias é um constante objetivo clínico laboratorial. Exame físico, métodos de imagem e dosagens laboratoriais compreendem o conjunto de auxílio diagnóstico no CaP. O antígeno prostático específico (PSA) é produzido pelo tecido prostático normal, bem como, em casos de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e no CaP. Sua dosagem constitui importante método laboratorial na prática médica, uma vez que se apresenta com grande valor no rastreamento, diagnóstico e acompanhamento dos casos de CaP. O entendimento do seu papel pelo farmacêutico-bioquímico, bem como, a interação com a equipe clínica mostra-se promissor para influenciar as decisões diagnóstico-terapêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE** – Câncer de próstata, antígeno prostático específico, marcador tumoral.

**SUMMARY** – Prostate cancer represents a public health concern whose proportions are becoming increasingly important. It is one of the most common neoplasia among men and it represents one of the main causes of death in the population. The search for diagnostic methods for this neoplasia has been a constant laboratory clinic target. Physical checking, imaging methods and laboratory dosages compose the range of diagnostic support when dealing with prostate cancer. The prostate specific antigen (PSA) is produced tissue as by benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Its dosage constitutes an important laboratory method among medical practices as it contributes significantly to tracing, diagnosis and checking prostate cancer cases. Understanding its role as well as interacting with all the members from the clinic board means a promising scenario that influences positively the diagnostic/therapeutic decisions.

**KEYWORDS** – Prostate cancer, prostate specific antigen, tumor marker.

## INTRODUÇÃO

Tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil, o Câncer de Próstata (CaP) representa a segunda maior causa de mortalidade entre os homens, sendo apenas superado pelo câncer de pele<sup>1</sup>. No Brasil, no ano de 1998, houve 7.140 óbitos por CaP e, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2001, deverão ocorrer 20.820 novos casos de CaP<sup>2</sup>. Essa doença tem como características elevação da incidência com o aumento da idade e apresentação de forma assintomática num elevado número de indivíduos<sup>3</sup>. Desde o início de programas de *screening*, que compreendem Toque Retal (TR), dosagem sérica do Antígeno Prostático Específico (PSA), Ultrassonografia Transretal (USTR) e Biópsia da Próstata (Tabela I), houve um acréscimo significativo no diagnóstico dessa neoplasia em função da descoberta de tumores com apresentação ainda assintomática<sup>4</sup>. Devido à abrangente incidência do Câncer de Próstata, realizamos uma revisão bibliográfica destacando a importância

TABELA I

Representação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e taxa de detecção do CaP através das técnicas de Toque Retal, Dosagem do PSA e Ultrassonografia Transretal segundo estudo de Cupp<sup>5</sup>

Método	Sensibilidade %	Especificidade %	Valor Preditivo Positivo	Taxa de Detecção do CaP
Toque Retal	69-89	84-98	26-35	1.3-1.7
PSA	57-79	59-68	40-49	2.2-2.6
USTR	36-85	41-79	27-36	2.6

da avaliação sérica do PSA nas decisões diagnósticas e terapêuticas acerca do CaP.

### Antígeno prostático específico

Em 1971, Hara *et al.* identificaram o PSA no líquido seminal denominando-o gama-seminoproteína<sup>6</sup>. Wang *et al.*, em 1979, isolaram no tecido prostático uma proteína referida com "prostate specific antigen", que, após tra-

Recebido em 29/8/2001

Aprovado em 16/10/2002

<sup>1</sup>Aluna do Curso de Especialização em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da PUCRS; <sup>2</sup>Médico Residente em Oncologia – Hospital São Lucas da PUCRS; <sup>3</sup>Acadêmico da Faculdade de Farmácia da PUCRS; <sup>4</sup>Bióloga, Mestre em Zoologia pela PUCRS;

<sup>5</sup>Professor Doutor, Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Faculdade de Biociências da PUCRS e Coordenador da disciplina de Bioquímica Clínica do Curso de Especialização em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da PUCRS.

balhos subsequentes, se revelou idêntica à gama-semi-noproteína do líquido seminal<sup>7</sup>. Análises posteriores definiram o PSA como uma enzima do grupo das Serino Proteases, semelhante à Caliceína, com peso molecular entre 30 e 34 kD sendo constituída por uma única cadeia glicoprotéica, que contém 237 aminoácidos e 4 cadeias laterais de carboidratos<sup>8</sup>. No cromossomo 9, está situado o gene responsável pela síntese do PSA sendo constituído por uma seqüência de 6 kpb<sup>8</sup>. O PSA possui meia-vida de 2,2 a 3,2 dias apresentando uma concentração sérica normal de até 4 ng/mL. Sua função fisiológica relaciona-se com a liquefação do coágulo seminal formado após a ejaculação. Na corrente sangüínea, o PSA apresenta-se sob duas formas moleculares, livre e conjugado. Até 95% encontram-se na forma conjugada a inibidores de Serino Proteases, principalmente  $\alpha_2$ -Macroglobulina (AMG) e  $\alpha_2$ -Antiquimiotripsina (ACT) estando também ligado a inibidores da Proteína C (PC), da  $\alpha_1$ -Antitripsina (AT) e inter-a-Tripsina (IT). Quando o PSA está conjugado à AMG, não há qualquer epítipo exposto, o que impede o reconhecimento imunológico. Entretanto, a ligação do PSA à ACT se faz de forma parcial, permitindo sua avaliação laboratorial. Assim, os métodos imunológicos disponíveis quantificam, essencialmente, o PSA livre, que corresponde entre 5% a 40% do total e a fração conjugada à ACT, que perfaz entre 60% a 95% do PSA imunodetectável no plasma. Esses conhecimentos são de extrema relevância, visto que estudos preliminares indicam haver uma elevação de aproximadamente 90% na proporção de PSA conjugado à ACT em pacientes com CaP quando comparados aos valores observados em indivíduos com Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)<sup>8</sup>. As concentrações séricas de PSA variam de acordo com a idade, sendo altas no nascimento e decaindo a níveis indetectáveis por volta dos seis meses de vida. Por volta dos dez anos de idade, essa glicoproteína reaparece com níveis crescentes até o final da puberdade<sup>9</sup>. Seus níveis séricos elevam-se nos casos de CaP, bem como, em processos benignos como HPB, Infecções e Infartos Glandulares, tornando esse marcador próstata específico, mas não câncer específico<sup>10</sup>. O PSA apresenta uma sensibilidade tal que, entre 6 e 18 meses antes do CaP tornar-se clinicamente sintomática, seus níveis podem estar persistentemente elevados<sup>10</sup>.

#### Métodos de avaliação do PSA sérico

O PSA sérico é determinado por Ensaio Imunoabsorvente Enzimático (ELISA) sendo o substrato TMB ou IRMA<sup>11</sup>. A segunda linha de ensaios para PSA baseia-se no uso de substratos quimioluminescentes com sensibilidade para valores inferiores a 1ng/mL<sup>12</sup>. No primeiro caso, são exemplos de kits CIS bio total PSA, Abbott IMX PSA e Beckman Coulter PSA total. Na segunda situação, citamos DPC-Immulite PSA e Bayer Immuno 1 PSA<sup>13,14</sup>.

#### Interferentes

#### Toque Retal

Crawford *et al.* realizaram estudo com 2.754 homens demonstrando que variações positivas no PSA após o toque somente ocorrem quando os níveis basais do antígeno situam-se acima de 20 ng/mL pelo método de Tandem-R. Como nessa faixa todos os pacientes são submetidos à Biópsia de Próstata, as alterações na concentra-

ção do PSA induzidas pelo TR deixam de ter implicações clínicas<sup>15</sup>. Chybowski *et al.* estudaram 143 indivíduos observando que oscilações nos valores do PSA ocorrem de forma semelhante tanto num grupo de homens submetido ao TR como num grupo controle, tendo efetuado duas dosagens de PSA<sup>16</sup>. Yuan *et al.* ao estudarem 43 pacientes, observaram que o PSA sérico eleva-se acima do limite normal em 9% dos mesmos após TR sendo que essa alteração perdura por 24 horas<sup>17</sup>. Assim, estando os níveis séricos do PSA abaixo de 20 ng/mL não há uma interferência do TR sobre a sua dosagem<sup>8</sup>.

#### Prostatite e Infarto da Próstata

O PSA sérico pode atingir até 80 ng/mL em casos de Prostatite e Infarto da Próstata sendo que tal valor regride a níveis basais em 4 semanas. Especificamente em relação à prostatite, a elevação do PSA relaciona-se à fase aguda da doença podendo elevar-se até 28 vezes o valor basal<sup>18</sup>. Para indivíduos nessa situação, preconiza-se dosagens seriadas do PSA. Se em 8 semanas os níveis desse marcador não se normalizarem, deve-se indicar a Biópsia da Próstata, visto que em 35% desses casos CaP local é encontrado<sup>19,20</sup>.

#### Biópsia e Ressecção Transuretral da Próstata

O PSA sérico eleva-se entre 6 a 50 vezes em pacientes submetidos à Biópsia Prostática<sup>8</sup>. É necessário um período entre 3 e 30 dias para um retorno aos níveis basais, permanecendo em 7% desses casos elevado após 4 semanas da biópsia<sup>21,17</sup>. A Ressecção Transuretral da Próstata, nos casos de HPB, eleva os níveis de PSA entre 10 e 50 vezes em 85% dos pacientes podendo atingir até 80 ng/mL regredindo a níveis basais em 30 dias. Tal efeito não é visto em pacientes com Adenocarcinoma de Próstata. É necessário um intervalo de 6 semanas após a realização de Biópsia e Ressecção Transuretral da Próstata para se efetuar dosagem de PSA<sup>22</sup>.

#### Trauma Prostático Persistente

Valores basais de PSA próximos a 6 ng/mL elevaram-se até a 3200 ng/mL em indivíduos submetidos a exercícios com bicicleta, sugerindo descarga do PSA na circulação após compressão perineal. Níveis séricos de PSA inexplicavelmente elevados exigem questionamento quanto à trauma na região perineal<sup>23,24</sup>.

#### Valor diagnóstico do PSA

Hammerer *et al.* demonstraram que cada grama de tecido hiperplásico benigno é responsável pelo aumento dos níveis sangüíneos de PSA em 0,31 ng/mL<sup>25</sup>. Entretanto, o tecido com processo maligno produz 10 vezes mais PSA, elevando os níveis séricos de PSA em 3,5 ng/mL por grama de tumor. À medida que aumentam a extensão e o estágio da neoplasia, elevam-se os níveis séricos de PSA<sup>26</sup>. Indivíduos com tumores localizados apresentam níveis séricos inferiores a 20 ng/mL enquanto na doença regional extraprostática, tais níveis situam-se entre 20 ng/mL e 80 ng/mL. Na presença de tumores disseminados, os valores sérico ultrapassam 100 ng/mL<sup>3</sup>. A Tabela de Partin (Tabela II) é um instrumento usado na escolha de tratamento, consistindo num normograma que possibilita a correlação entre o valor de PSA, o estágio clínico e a escala de Gleason para predizer se o tumor está confinado à próstata<sup>27,5</sup>. Sob o ponto de vista prático, o sistema de gradação histológica mais usado é o

proposto por Gleason, que valoriza o padrão glandular e a relação entre a glândula e o seu estroma. Ocorre a classificação dos tumores em cinco graus, atribuindo-se às lesões mais diferenciadas grau 1 e às mais indiferenciadas, grau 5. Como a Adenocarcinoma de Próstata apresenta mais de um padrão histológico, o valor final é atribuído somando-se o grau do padrão primário (predominante) com o grau do padrão secundário (segunda menor área apresentada). Assim, tumores mais diferenciados apresentam grau 2 (1+1) e os mais indiferenciados, grau 10 (5+5)<sup>3</sup>. Um paciente com estágio clínico T3a, Gleason de 6 e PSA sérico de 50 ng/mL tem 5% de chance de apresentar um tumor localizado apenas na próstata, ou seja, há 95% de chance da doença estar disseminada. Caso esse paciente apresentasse um PSA sérico entre 0-4 ng/mL, a chance do tumor localizado seria de 42%. Conforme o aumento da idade, há uma variação fisiológica nos níveis de PSA<sup>18</sup>. Oesterling *et al.* demonstraram que a concentração sérica do PSA eleva-se a cada década e, através de dados obtidos com 471 homens, definiu o limite superior de PSA para cada faixa de idade (Tabela III). Assim, concluiu que o valor de 4 ng/mL deve ser corrigido para cada faixa etária<sup>28</sup>. A dosagem sérica do PSA associada ao toque retal é cada vez mais usada em programas de *screening* para o CaP. Preconiza-se que, nos indivíduos com mais de 50 anos, seja feito anualmente e, naqueles com história familiar ou de raça negra, mais precocemente. Em pacientes com mais de 50 anos, a probabilidade de detecção do CaP está diretamente relacionada com o nível sérico de PSA. Somente 10% dos pacientes apresentam um PSA superior a 4 ng/mL nos programas de *screening* sendo que 1/3 desses tem diagnóstico de CaP<sup>4</sup>. Níveis séricos de PSA inferiores a 4 ng/mL em indivíduos com toque prostático normal acompanham-se de riscos desprezíveis para CaP. Se os valores do PSA superam 10 ng/mL, a chance de existir neoplasia prostática é de cerca de 55% estando indicada biópsia. Níveis de PSA entre 4 ng/mL e 10 ng/mL indicam um risco de se identificar um CaP de cerca de 25% sendo que nesse caso superpõe-se a presença de HPB. Nesses pacientes, biópsia rotineira apresenta resultados negativos em 75% dos casos<sup>3</sup>. Smith *et al.* questionaram o uso de um PSA sérico de 4 ng/mL como limite de corte para indicação de biópsia demonstrando que a incidência de CaP em pacientes com PSA entre 2,6 ng/mL e 4 ng/mL é similar à constatada em pacientes com PSA pouco superior a 4 ng/mL. Também ficou provado que indivíduos de raça negra apresentam incidência de CaP duas vezes maior mesmo nas faixas entre 2,6 ng/mL e 4 ng/mL<sup>29</sup>. Devido à pouca especificidade do PSA, para se evitar a realização desnecessária de biópsia, tem-se recorrido a avaliações adicionais: análise da relação entre PSA Livre e PSA Total séricos, velocidade de ascensão do PSA, valor máximo tolerável e densidade do PSA<sup>30</sup>.

#### Análise da relação entre PSA Livre e PSA Total séricos

O tecido maligno produz menor quantidade de PSA Livre. A partir disso, estabeleceu-se a fração que divide o PSA Livre pelo PSA Total<sup>31</sup>. A relação entre o PSA Livre e o PSA conjugado à ACT é menor em função da maior produção da forma conjugada na neoplasia maligna se comparada à HPB<sup>32</sup>. Oesterling *et al.* sugerem que, quando a relação entre o PSA Livre e o PSA Total ultrapassa 0,15, as chances de se identificar um CaP elevam-se significativamente<sup>33</sup>. Na HPB, a relação entre PSA Livre e

**TABELA II**  
Probabilidade de doença confinada à próstata baseada no estágio clínico, classificação de Gleason e dosagem do PSA<sup>5</sup>

Gleason Score	T1a	T1b	T1c	T2a	T2b	T2c	T3a
<b>PSA 0.0 - 4.0 ng/mL</b>							
2-4	100	85	92	88	76	82	-
5	100	78	81	81	67	71	-
6	100	68	69	72	54	69	42
7	-	54	55	61	41	46	-
8-10	-	-	-	48	51	-	-
<b>PSA 4.1 - 10.0 ng/mL</b>							
2-4	100	78	82	83	67	61	-
5	100	70	71	83	56	64	43
6	100	53	59	62	44	48	33
7	100	39	43	51	32	37	26
8-10	-	32	33	39	22	25	12
<b>PSA 10.1 - 20 ng/mL</b>							
2-4	100	-	-	61	52	-	-
5	100	49	55	58	43	37	37
6	-	36	41	44	28	37	19
7	-	24	24	36	19	24	14
8-10	-	11	-	29	14	15	9
<b>PSA &gt; 20 ng/mL</b>							
2-4	-	-	33	20	7	-	-
5	-	-	24	32	-	3	-
6	-	-	22	14	11	4	5
7	-	-	7	18	4	5	3
8-10	-	-	3	3	1	2	2

**TABELA III**  
Valores do PSA Sérico por idade<sup>28</sup>

Faixa etária (anos)	PSA mediano ng/mL	Limite superior ng/mL
40-49	0,7	2,5
50-59	1,0	3,5
60-69	1,4	4,5
70-79	2,0	6,5

PSA Total é maior que 25%. Entretanto, em pacientes com CaP, a relação tende a ficar abaixo da 10%<sup>3</sup>.

#### Velocidade de ascensão do PSA

Carter *et al.* estudaram os níveis de PSA em plasma armazenado de um grupo de homens inicialmente normais e acompanhados através de exames periódicos por pelo menos 7 anos. Observou uma rápida elevação do PSA sérico, na ordem de 0,75 ng/mL por ano, nos indivíduos que desenvolveram CaP. Indivíduos normais e com HPB apresentaram um aumento mais lento do PSA sérico com incremento anual inferior a 0,75 ng/mL<sup>34</sup>. Assim, o cálculo da velocidade de ascensão do PSA é mais útil do que dosagens isoladas para que se possa distinguir os casos de CaP e HPB<sup>34</sup>. Em pacientes com CaP, os níveis de PSA tendem a subir anualmente entre 50% e 100%. Quando a elevação é superior a 200% ao ano, é provável que a doença de base seja uma prostatite, visto que tal processo provoca elevações substanciais nos níveis de PSA, que pode atingir valores de 70 a 80 ng/mL em pro-

cessos agudos febris<sup>3</sup>. Entretanto, questiona-se o uso da velocidade do PSA como meio diagnóstico, visto que o PSA sérico pode apresentar uma variabilidade de até 30% no mesmo indivíduo num pequeno intervalo de tempo. A variação da técnica também pode acarretar diferenças nos resultados do PSA sérico obtidos de uma mesma amostra, sendo descritas variações de até 10,5%<sup>35</sup>.

### Valor máximo tolerável do PSA

O valor máximo compatível com crescimento benigno da próstata equivale ao peso (volume) da glândula determinado pela ultrassonografia dividido por 10. Um homem com PSA sérico de 7 ng/mL provavelmente não apresenta CaP se a glândula pesar 80g (valor máximo tolerável igual a 8), mas talvez seja portador de neoplasia local se a próstata pesar 30g. Devem ser feitas avaliações anuais quando os níveis de PSA situam-se acima de 2 ng/mL e a cada 2 anos se os níveis são inferiores a 2 ng/mL<sup>3</sup>.

### Densidade do PSA

O valor do PSA se altera com o aumento no volume prostático, sendo pequena a produção em casos de HPB e acentuada no CaP. Benson *et al.* introduziram o conceito da Densidade do PSA (PSAD), correspondente ao quociente entre o PSA sérico e o peso ou volume da próstata determinado pela ultrassonografia<sup>36,37</sup>. Seaman recomenda que pacientes com PSA entre 4ng/mL e 10 ng/mL e PSAD superior a 0,15 sejam biopsiados<sup>38</sup>. A PSAD possui duas limitações: falha na determinação exata do volume da próstata pela ultrassonografia e a variabilidade do conteúdo glandular versus estroma, variável de glândula para glândula<sup>39</sup>.

### Monitoração do tratamento e PSA

O acompanhamento de pacientes com CaP submetidos às diferentes formas de tratamento foi bastante favorecido pela avaliação do PSA<sup>40</sup>. Com a redução da massa tumoral ou erradicação da neoplasia há, respectivamente, queda ou desaparecimento desse marcador no plasma. Uma elevação subsequente, após queda inicial, sugere fortemente presença de doença focal e/ou à distância<sup>40,41,42</sup>. De uma maneira geral, os tumores confinados à glândula devem ser tratados com cirurgia, enquanto que os disseminados devem receber abordagem endócrina<sup>41,42</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. **Cancer Net. Screening for prostate cancer.** <http://www.cancernet.ncl.nih.gov>. Capturado em 12 de junho 2001.
2. **Ministério da Saúde. Câncer de próstata.** INCA. <http://www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata.html>. Capturado em 31 de agosto 2001.
3. **Srugi, M.** Adenocarcinoma de Próstata. In: **Barata e Carvalho.** *Urologia: princípios e prática.* 1ª Edição. Porto Alegre. Artes Médicas. cap.34. p.356-372. 1999.
4. **Srugi, M.; Coutinho, A.; Sarkis, A.** HPB e câncer de próstata. In: *Encontro de Consenso Nacional sobre HPB.* Junho de 1996; Campos do Jordão, São Paulo. Sociedade Brasileira de Urologia: BG Cultural, p.56-64.
5. **Oesterling, J.; Fuks, Z.; Lee, C. T.; Scher, H. I.** Cancer of the prostate. In: **De Vita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, A. S.** *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 5th edition. Lippincot - Raven Publishers, Philadelphia. Chapter 33.4, p.1322-1386. 1997.
6. **Hara, M.; Innore, T.** Some physico-chemical characteristics of gamma-seminoprotein, on antigen component specific for human seminal plasma. *J. J. Legal Med.* 5:322-324. 1971.
7. **Wang, M. C.; Valenzuela, I. A.; Murphy, G. P. et al.** Purification of human prostatic specific antigen. *Invest Urol.* 17:159-163. 1979.
8. **Srugi, M.** Antígeno Prostático Específico. In: **Srugi, M.** *Hiperplasia Prostática.* Rio de Janeiro: Record; 1995. Cap. 5, p. 89-111.
9. **Mercatelli, C.; Laudarina, H.; Picciarelli, F.** Antígeno Prostático Específico (PSA). *Laes & Haes.* 104:128-130. 1997.
10. **Azambuja, E.; Faoro, D. B.; Chiesa, D.; Lagos, S.** O uso dos marcadores tumorais em oncologia. In: *ACTA Médica.* Porto Alegre: EDIPUCRS. p.543-555. 1994.
11. **Reiter, W.; Stieber, P.; Schmeller, N.; Nagel, D.; Hofmann, K.; Fateh-Moghadam, A.** Total and free PSA: a methodical and clinical evaluation of five assays. *Anticancer Res.* 17(6D):4759-65. 1997.
12. **Ferguson, R. A.; Yu, H.; Kalyvas, M.; Zammit, S.; Diamandis, E. P.** Ultra-sensitive detection of prostate-specific antigen by a timeresolved immunofluorometric assay and the immulite immunochemiluminescent third-generation assay: potential application in prostate and breast cancers. *Clin. Chem.* 42(5):675-84. 1996.
13. **Haese, A.; Huland, E.; Graefen, M.; Hammerer, P.; Noldus, J.; Huland, H.** Ultrasensitive detection of prostate specific antigen in the followup of 422 patients after radical prostatectomy. *J. Urol.* 161(4):1206-11. 1999.
14. **Morris, D. L.; Dillon, P. W.; Very, D. L.; Ng, P.; Kish, L.; Goldblatt, J. L. et al.** Bayer Immuno 1 PSA assay: an automated, ultrasensitive method to quantitate total PSA in serum. *J. Clin. Lab. Anal.* 12(1):65-74. 1998.
15. **Crawford, E. D.; Schultz, M. J.; Clejan, S. et al.** The effect of digital rectal examination on prostate-specific antigen levels. *JAMA.* 267:2227-2228. 1992.
16. **Chybowski, F. M.; Bergstrath, E. J.; Oesterling, J. E.** The effect of digital rectal examination on the serum prostate-specific antigen concentration. *J. Urol.* 148:83-86. 1992.
17. **Yuan, J. J.; Coplen, D. E.; Petros, J. A. et al.** Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate-specific antigen levels. *J. Urol.* 147:810-814. 1992.
18. **Mello, E. A.; Rios, L. A. S.; Mattos Jr, D.** The influence of age and prostatic volume on serum prostate specific antigen levels in patients with benign prostatic hyperplasia. *J. Bras. Urol.* 26:596-601. 2000.
19. **Gromatzky, C.; Mitre, A. L.; Neto, E. C.; Arap, S.** Prostatite crônica: influência sobre a dosagem sérica do PSA. *J. Bras. Urol.* 25:59-61. 1999.
20. **Neal Jr, D. E.; Clejan, S.; Sarma, D. et al.** Prostate specific antigen and prostatitis I: effect of prostatitis on serum PSA in the human and nonhuman primate. *Prostate.* 17:317-325. 1990.
21. **Oesterling, J. E.; Rice, D. C.; Glenski, W. J. et al.** Effects of cystoscopy, prostate biopsy and transurethral resection of the prostate on the serum prostate-specific antigen concentration. *Urology.* 42:276-282. 1993.
22. **Versey, S. G.; Goble, N. M.; Stower, M. J. et al.** The effects of transurethral prostatectomy on serum prostate specific antigen. *J. Bras. Urol.* 62:347-351. 1998.
23. **Husserl, F. E.** Marked elevation of prostate-specific antigen after prolonged prostatic trauma. *Ann. Int. Med.* 119:956. 1993.
24. **Rana, A.; Chisholm, G.** He sold his bike for a low prostate specific antigen. *J. Urol.* 151:700. 1994.
25. **Hammerer, P. G.; McNeal, J. E.; Stamey, T. A.** Correlation between serum prostate specific antigen levels and the volume of the individual glandular zones of human prostate. *J. Urol.* 153:111-114. 1995.
26. **Stamey, T. A.; Kabalin, J. N.** Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J. Urol.* 141:1070. 1989.
27. **Barrios, C. H.** Câncer do trato genitourinário/Câncer de próstata. In: **Murad, A. M.; Katz, A.** *Oncologia - Bases clínicas do tratamento.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.220-227. 1996.
28. **Oesterling, J. E.; Jacobsen, S. J.; Chute, C. G. et al.** Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. *JAMA.* 270:860-864. 1993.
29. **Smith, D. S.; Carvalhal, G. F.; Mager, D. E.; Bullok, A. D.; Catalona, W. J.** Use of lower prostate specific antigen cutoffs for prostate cancer screening in black and white men. *Clinical Urology.* 160:1734-1738. 1998.
30. **Smith, D. S.; Catalona, W. J.** Longitudinal screening for PSA. *JAMA.* 276:1309-1315. 1996.
31. **Souto, C. A. V.** Marcadores em câncer de próstata. *J. Bras. Urol.* 25:16-19. 1999.
32. **Partin, A. W.; Oesterling, J. E.** The clinical usefulness of prostate specific antigen: update. *J. Urol.* 152:1358-1368. 1994.
33. **Oesterling, J. E.; Lilja, H.** Discovery of molecular forms of serum PSA is a major advancement in prostate detection. *AUA Today.* 8(2):1-2. 1995.
34. **Carter, H. B.; Pearson, J. D.; Metter, E. J. et al.** Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 267:2215-2220. 1992.
35. **Barata, H. S.; Carvalhal, G. F.** *Urologia: princípios e prática.* Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 1999.
36. **Benson, M. C.; Whang, I. S.; Olsson, C. A.** The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J. Urol.* 147:817-821. 1992.
37. **Benson, M. C.; Whang, I. S.; Pantuck, A.** Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* 147:815-816. 1992.
38. **Seaman, E.; Whang, I. S.; Olsson, C.A.** PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management. *Urol. Clin. North Am.* 20:653-663. 1993.
39. **Bates, T. S.** Determination of prostatic volume with transrectal ultrasound. A study of intra-observer and inter-observer variation. *J. Urol.* 155:1299-1300. 1996.
40. **Murad, A. M.; Katz, A.** *Oncologia - Bases clínicas do tratamento.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1996.
41. **Pompeo, A. C. L.; Damiano, R.** Aspectos práticos do tratamento do carcinoma localizado da próstata (T1/T2). *J. Bras. Urol.* 25:20-25. 1999.
42. **Srugi, M.; Simon, S. D.** *Câncer urológico.* São Paulo: Platina 1990.

Endereço para correspondência

Dr. Patrick B. Gaspareto

Laboratório de Pesquisa em Biofísica - Faculdade de Biociências da PUCRS.

Av. Ipiranga, 6681 - prédio 12C - sala 263 - 90619-900

C.P. 1429. Porto Alegre - RS

# Avaliação comparativa entre duas técnicas sorológicas para HIV em pacientes com diferentes níveis de carga viral\*

## Comparative evaluation between two serologic techniques to HIV in patients with different levels viral

Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino, Fabia Emanuelle Lopes de Medeiros, Renata Gomes Alves, Yvana Trindade Almeida, Ralfo Cavalcante de Medeiros & Valéria Cristina Ribeiro Dantas

**RESUMO** – O HIV é um retrovírus com genoma RNA (ácido ribonucléico), que é membro da família *Retroviridae*, na subfamília *lentivírus*. O diagnóstico laboratorial do HIV é baseado principalmente em técnicas sorológicas nas quais é feita a pesquisa de anticorpos e também de antígenos associados. A utilização da biologia molecular possibilita a detecção direta do HIV e sua utilização é estratégica em várias circunstâncias. O objetivo deste trabalho foi fazer a comparação entre duas técnicas de triagem; uma que pesquisa apenas anticorpos, uma outra que pesquisa antígeno-anticorpo com dupla detecção e a terceira foi à quantificação da carga viral de pacientes conhecidamente soro-positivos em diferentes estágios de doença. As amostras de plasma foram colhidas com os cuidados necessários para primeiramente ser realizada a detecção da carga viral, logo após foram submetidas às técnicas de enzimaímoensaio e fluorimetria, isto em um total de 16 amostras de pacientes em diferentes estágios de doença para ser aplicada a sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas. Em nosso estudo, as aplicações das técnicas mostraram uma concordância em 100% dos casos, nos quais tivemos o cuidado de obter pacientes com carga viral tanto de baixa como de elevada quantificação, possibilitando assim a boa sensibilidade das técnicas empregadas.

**PALAVRAS-CHAVE** – Carga viral, sensibilidade, fluorimetria, HIV.

**SUMMARY** – The HIV is a retrovirus with a RNA genome. It is of the family of *Retroviridae*, in the *lentivirus* subfamily. The laboratorial diagnostic of HIV is leader in serological methods that are made a research to antibody and allied antigens. To prefer of the molecular biology make possible the detection of HIV. The objective of this work is to compare two methods of exams. One witch find antibodies, another witch find antigens and antibodies with double detection and third the qualification of the viral level in patients positives to HIV in different levels of they illness. The most of the plasmas were collected with necessary attention to detect the viral level, later they were submitted to an enzyme immunoassay and fluorescent methods. In our research the application of these methods shown a agreement in 100% cases, that we had careful to take patients with low qualification of viral level and high qualification, making possible a good sensibility of those methods.

**KEYWORDS** – Viral level, sensibility, fluorimetric, HIV.

### INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) vem se alastrando de forma assustadora nos últimos anos. Dados epidemiológicos no Brasil mostram que até 30 de junho de 2001 foram confirmados 215.810 casos e no Rio Grande do Norte um total de 1.072 casos confirmados (SINAM – Sistema de Notificações e Agravos/ Ministério da Saúde). Os primeiros testes para o diagnóstico de infecção pelo HIV foram constituídos baseados na detecção de anticorpos contra HIV-1. Entretanto em 1986, um novo vírus da imunodeficiência, conhecido como HIV-2, foi descoberto em pacientes da África. A caracterização deste vírus relevou características biológicas, morfológicas e clínicas muito semelhante as do HIV-1. Recentemente foram descritas variantes genômicas (subtipos), tanto de HIV-1 quanto de HIV-2, em pacientes infectados de diversas regiões geográficas. O HIV-1 é classificado em dois grupos, M (*major*) e o O (*outlier*) que apresentam variabilidade genética de até 30%. O grupo M é dividido em nove subtipos; (A, B, C, D, E, F, G, H e I) e no grupo O apenas um. No Brasil já foram identificados os subtipos B, C, F e D de HIV-1 do grupo

M. Estudos realizados indicam que a grande maioria das amostras analisadas pertencem ao subtipo B (89%) aproximadamente, 10% ao subgrupo F e 1% ao subgrupo C. Inúmeras metodologias foram desenvolvidas e estão sendo aplicadas para estudo de marcadores sorológicos e moleculares para a determinação da infecção e doença causada pelo HIV-1 e 2. A maioria das técnicas empregadas apresentam grande eficiência, nas quais destacamos a determinação sorológica de anticorpos circulantes, detecção e quantificação de antígenos virais (Ag p24), isolamento do vírus, identificação e quantificação de genomas, DNA ou RNA<sup>4,8,15,21</sup>.

As principais formas de transmissão do HIV são: sexual, seja entre parceiros homo, hetero, bissexual<sup>1</sup>, sanguínea (em receptores de sangue ou hemoderivados e em usuários de drogas injetáveis, ou UDI) e vertical (da mãe para o filho, durante a gestação, o parto ou por aleitamento). Além dessas formas, mais frequentes, também pode ocorrer a transmissão ocupacional, ocasionada por acidente de trabalho, em profissionais da área da saúde que sofrem ferimentos com instrumentos perfuro-cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV<sup>12,18</sup>.

Recebido em 31/7/2002

Aprovado em 23/8/2002

\*Laboratório de Imunologia Clínica da UnP – Universidade Potiguar, Natal/RN.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 16 amostras provenientes de pacientes soros reagentes, com idade entre 22 a 52 anos, de ambos os sexos.

As amostras de sangue foram obtidas através de punção de sangue periférico, por coleta a vácuo, em tubos com anticoagulante EDTA, em condições estéreis para obtenção de plasma, o qual foi centrifugado e separado no período máximo de 4 horas após a coleta, refrigerado logo em seguida.

A obtenção de plasma foi para a determinação da quantificação da carga viral do HIV, e, logo depois, para as determinações imunoenzimáticas empregadas.

Os procedimentos realizados seguiram todas as normas de biossegurança, desde a proteção individual ao descarte do material biológico utilizado no desenvolvimento dos ensaios laboratoriais.

### Técnica Fluorimétrica (HIV DUO – Sistema Minividas BioMérieux)

A Fluorimetria emprega a associação de duas reações imunoenzimáticas com uma detecção final em fluorescência (ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*)<sup>13</sup>. O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem. Os reagentes são distribuídos no barrete/tira. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no equipamento. A reação é dividida em duas etapas, nas quais a primeira é realizada na parte inferior do cone e a segunda na parte superior. A revelação final é feita simultaneamente sobre as duas partes.

### Reação 1: Detecção de imunoglobulinas G anti-HIV1 (incluindo as do sub-tipo O) e anti-HIV2

### Reação 2: Detecção de antígeno p24

#### Composição dos reagentes

- Barretes (Tabela I)
- Cones – Sensibilizados com peptídios sintéticos gp41 e gp36 (proteínas transmembranárias), e três anticorpos monoclonais anti-p24 de rato.
- Controle positivo
- Controle negativo
- Calibrador

#### Procedimento

- 1) O procedimento foi realizado após os reagentes atingirem a temperatura ambiente.
- 2) Introduziu-se no sistema Minividas os dados correspondentes aos pacientes.
- 3) Fez-se a homogeneização das amostras, calibrador e controles positivo e negativo.
- 4) Colocou-se 200 µL da amostra, calibrador e os controles no primeiro poço do barrete e introduziu-se no sistema durante 100 minutos (bioMérieux – 1998).

#### Valores de referência

- Não reagente - < 0,25 (Index)
- Indeterminado - ≥ 0,25 a < 0,35 (Index)
- Reagente - ≥ 0,35 (Index)

### Técnica de enzaimunoensaio (Genscreen HIV 1/2 version 2)

É um enzaimunoensaio baseado no princípio da técnica "sandwich", em duas etapas, para a detecção de anticorpos monoclonais associados aos vírus HIV 1 e/ou

TABELA I  
Descrição dos reagentes (Barrete)

Poços	Reagentes
1	Amostra
2	Diluyente da amostra
3	Conjugado 1: anticorpo monoclonal de rato anti-IgG humanas marcada com fosfatase alcalina + TRIS + estabilizantes protéicos e químicos + azida sódica + sulfato de gentamicina
5	Conjugado 2: anticorpo (coelho) anti-p24 marcados com biotina + TRIS + Triton 2% + soro de coelho 5% + estabilizantes protéicos e químicos + azida sódica + sulfato de gentamicina
7	Marcador: estreptavidina marcada com fosfatase alcalina + TRIS + albumina bovina + estabilizantes protéicos e químicos + azida sódica + sulfato de gentamicina
4-6-8-9	Tampão de lavagem: TRIS + estabilizantes protéicos e químicos + azida sódica
10	Cuvete de leitura com substrato: 4 metil-umbeliferil fosfato + DEA + azida sódica

HIV 2 em soro ou plasma humano. Baseia-se na utilização de uma fase sólida, marcada com antígenos purificados (gp160 e proteína p25 recombinante do HIV 1 e um peptídeo que se assemelha ao epítipo imunodominante do HIV 2, a proteína de envelope gp120) e um conjugado antígeno-peroxidase (peptídeos que imitam o epítipo imunodominante das glicoproteínas de envelope HIV 1 e HIV 2 e proteína recombinante de nucleocapsídeo)<sup>7</sup>.

#### Composição dos reagentes

- R1- Tiras de oito cavidades sensibilizadas com antígenos HIV 1 e 2. (HIV1: gp160 rDNA + p25 rDNA/ HIV2: gp36).
- R2- Solução de lavagem concentrada.
- R3- Soro controle negativo (humano).
- R4- Soro controle "cut-off" (humano).
- R5- Soro controle positivo (humano).
- R6- Diluyente da amostra.
- R7a- Conjugado (antígenos HIV 1 e 2 marcados com peroxidase).
- R7b- Diluyente do conjugado.
- R8- Tampão substrato de peroxidase.
- R9- Cromógeno (solução contendo tetrametil benzidina-TMB).
- R10- Solução de bloqueio.

#### Procedimento

- 1) Identifica-se as amostras;
- 2) Prepara-se a solução de lavagem (diluir a 1/10 com água destilada → 50 mL R2 + 450 mL água);
- 3) Distribui-se 25 µL de diluyente a cada cavidade da placa;
- 4) 75 µL do soro controle negativo (R3) na cavidade A1;
- 5) 75 µL do soro controle "cut-off" (R4) nas cavidades B1, C1 e D1;
- 6) 75 µL do soro controle positivo (R5) na cavidade E1;
- 7) 75µL das amostras nos restantes da placa;
- 8) Homogeneização da microplaca após as pipetagens;
- 9) A distribuição da amostra foi controlada visualmente, após a adição da amostra, o diluyente mudou de cor púrpura para azul;
- 10) Cobri-se a microplaca com filme adesivo, sem deixar bolhas de ar;
- 11) Incuba-se a microplaca em banho-maria a 37°C por 30 (± 5) minutos;

- 12) Remove-se o filme adesivo, colocamos na lavadora automática, onde houve três lavagens. O volume residual deve ser de menos de 5 µL, para secar a placa invertemos sobre o papel absorvente;
- 13) Distribui-se 100 µL da solução de conjugado a cada cavidade, homogeneizando antes do uso e incubamos por 30 minutos em temperatura ambiente (18-30°C);
- 14) Idem ao nº 12;
- 15) Cuidadosamente dispensa-se em cada cavidade 80 µL da solução de desenvolvimento da reação enzimática (R8 + R9 → 10 mL para 1 mL) recentemente preparada, deixando-se a reação desenvolver no escuro por 30 (± 5) minutos em temperatura ambiente (18-30°C);
- 16) 100 µL da solução de bloqueio (R10), utilizando-se a mesma seqüência e tempo utilizados para dispensar a solução de desenvolvimento;
- 17) Realiza-se a leitura, logo após o bloqueio da reação.

#### Interpretação dos valores de referência

Amostras com valores de absorbância menor que o valor do "cut-off" são consideradas não reagentes. Próximos ao valor "cut-off", devem ser interpretadas com cautela. Amostras com valores de absorbância igual ou maior que 15% do valor do "cut-off" são consideradas reagentes<sup>17</sup>.

#### Absorbância dos testes

- ≥ 1,79 – Reagente
- 1,33 a 1,78 – Indeterminado
- ≤ 1,32 – Não reagente

### Técnica de Biologia Molecular

#### Detecção da carga viral (HIV-1 RNA QT – NASBA - Amplification System)

A quantificação pelo teste baseia-se na amplificação concomitante do RNA de HIV-1 da amostra, juntamente com controles internos, técnica que se mostrou superior a outros métodos quantitativos. A quantidade de RNA amplificado é medida por meio da eletroquimioluminescência (ECL)<sup>20</sup>. O teste é composto de quatro estágios: liberação, isolamento, amplificação e detecção do ácido nucléico<sup>10</sup>.

A liberação do ácido nucléico ocorre após adição do tampão de lise (ticionato de guanidina e Triton X-100) na amostra, com isso, as partículas virais e células presentes são desintegradas e as RNA-ases e as DNA-ases são inativadas e o ácido nucléico é liberado<sup>10</sup>.

O método de isolamento do ácido nucléico contém três amostras de RNA sintético (Qa, Qb, Qc) com concentrações conhecidas, com níveis diferentes, que são acrescentadas ao tampão de lise que contém o ácido nucléico liberado, sendo utilizadas como controle interno. Em condições de salinidade elevada, todo ácido nucléico se liga às partículas de dióxido de sílica. Essas partículas que atuam como fase sólida são lavadas várias vezes e, no final, o ácido nucléico é eluído da fase sólida<sup>10</sup>.

Amplificação do ácido nucléico baseia-se na extensão do "primer": o RNA do tipo selvagem e os RNAs dos controles são utilizados como modelos para a extensão do "primer" 1 *gag* (que contém o sítio de reconhecimento da polimerase de T7-RNA) pela transcriptase reversa do vírus do mieloblasto das aves (AMV-RT). A extensão é seguida pela degradação da cadeia do RNA pela RNA-ase H, síntese do segundo filamento de DNA através da extensão do primer 2 pela AMV-RT e síntese de RNA pela

polimerase de T7-RNA. Com a síntese do RNA, o sistema entra na fase cíclica isotérmica, resultando no acúmulo do RNA de tipo selvagem e RNAs dos controles amplificados<sup>5</sup>.

A detecção do RNA de HIV-1 baseia-se no princípio de eletroquimioluminescência (ECL) do sistema de NASBA QR<sup>14</sup>. Para separar as amostras amplificadas (Teste, Qa, Qb, Qc) são acrescentadas alíquotas a quatro soluções de hibridação, sendo cada uma específica. As amostras amplificadas respectivas são hibridizadas com uma sonda oligopérola (isto é, pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina ligada a oligobiotina que são utilizadas como fase sólida) e uma sonda marcada com rutênio. As pérolas magnéticas que transportam o complexo de amostra amplificada e hibridizada/sonda são capturadas na superfície do eletrodo por meio de um ímã. A tensão aplicada a esse eletrodo desencadeia a reação de ECL. A luz emitida pelas sondas marcadas com rutênio é proporcional à quantidade de amostra amplificada. O cálculo baseado nas quantidades relativas das quatro amostras amplificadas revela a quantidade original de RNA de HIV-1 do tipo selvagem<sup>5</sup>.

#### Valores de referência

Limite detectável - ≥ 80 cópias de RNA de HIV/mL

## RESULTADOS

Nas metodologias empregadas de Elisa (Genscreen) e Fluorimetria (HIV DUO), em todas as amostras, obteve-se resultados reagentes, demonstrando uma correlação de 100% entre as amostras (Tabela II).

As amostras dos 16 pacientes foram quantificadas através da carga viral, dos quais, 46,5% dos pacientes apresentaram-se no limite mínimo detectável de 80 cópias de RNA do HIV. Correspondendo a 6,25% dos pacientes o nível detectável foi de 850.000 cópias/mL representando o valor mais elevado do grupo estudado. (Tabela II).

## DISCUSSÃO

Nos países desenvolvidos, a exposição do HIV por relações homossexuais ainda é a responsável pelo maior número de casos, embora as relações heterossexuais es-

**TABELA II**  
Representação dos resultados obtidos através das técnicas imunoenzimáticas e molecular empregadas

Nº	Carga viral (cópias/mL)	Genscreen (absorbância)	Mini Vidas (index)
1	790	Reagente (OVER)	Reagente (12,92)
2	80	Reagente (OVER)	Reagente (12,95)
3	38000	Reagente (3,498)	Reagente (12,96)
4	80	Reagente (2,137)	Reagente (12,96)
5	2700	Reagente (2,213)	Reagente (12,95)
6	80	Reagente (2,201)	Reagente (13,72)
7	3300	Reagente (2,544)	Reagente (13,95)
8	160	Reagente (2,564)	Reagente (13,90)
9	80	Reagente (2,574)	Reagente (13,84)
10	80	Reagente (2,925)	Reagente (13,91)
11	1500	Reagente (3,000)	Reagente (12,51)
12	80	Reagente (2,428)	Reagente (12,72)
13	49000	Reagente (3,014)	Reagente (12,92)
14	80	Reagente (3,253)	Reagente (12,95)
15	850000	Reagente (2,426)	Reagente (12,83)
16	32000	Reagente (3,316)	Reagente (13,08)

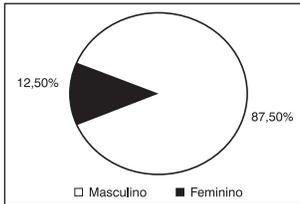


FIG. 1 - Frequência do sexo masculino e feminino nas amostras.

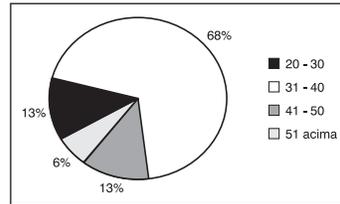


FIG. 2 - Percentual de pacientes estudados divididos por faixa etária.

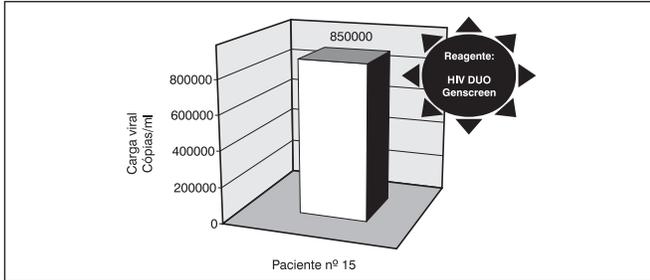


FIG. 3 - Maior quantidade de cópias de RNA-HIV/mL.

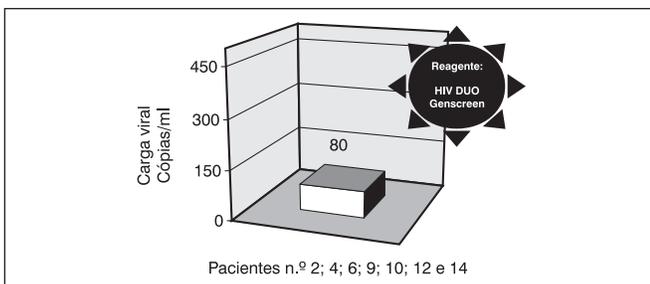


FIG. 4 - Menor quantidade de cópias de RNA-HIV/mL.

tenham aumentando proporcionalmente como uma tendência na dinâmica da epidemia<sup>2,19</sup>.

Em nosso estudo, 87,50% dos pacientes são do sexo masculino, enquanto a incidência do sexo feminino é de 12,50% (Figura 1).

Em termos de faixa etária o maior número de caso de pacientes soros reagentes foi observada, entre 31-40 anos, correspondendo a 68% dos pacientes estudados. (Figura 2).

Na amostra de número 15, a quantificação das cópias de RNA do HIV mostrou-se elevada. Pode-se relacionar o aumento do número de partículas virais com o déficit de atividade da resposta imunológica, representado pelas células B, que no mecanismo de defesa em resposta ao vírus, a produção encontra-se insuficiente devido ao grande tropismo do vírus aos linfócitos, principalmente aos linfócitos T, que regula a atividade das células B, através da síntese de citocinas. Uma vez as células T diminuídas na patogenidade do vírus, conseqüentemente as células B, também estarão diminuídas<sup>6,18</sup>.

A Figura 3 demonstra o elevado número de cópias de RNA do HIV da amostra de número 15, que obteve resultados reagentes nos métodos ELISA (Genscreen) e Fluorimetria (HIV DUO)<sup>21</sup>.

Em resposta a agentes infecciosos, ocorre a ativação de células, que resulta a liberação de várias substâncias que vão induzir e desencadear uma série de atividades, na tentativa de destruir ou inibir a ação destes agentes<sup>9</sup>. Uma destas células envolvidas são os linfócitos. A ativação principal dos linfócitos T resulta no estímulo de linfócitos B e, respectivamente, a produção de isótopos de imunoglobulinas<sup>11,21</sup>.

A ativação do sistema imunológico, em resposta ao estímulo antigênico, produz mediadores da resposta imune que contribuem na defesa dos agentes infecciosos.

Com a utilização da terapia anti-retroviral, podemos obter uma melhora da resposta imunológica destes pacientes, refletindo, assim, em um aumento de células B<sup>16,18</sup>.

As amostras de números 2, 4, 6, 9, 10, 12 e 14 (Figura 4) representam pacientes que conseguiram diminuir o número de partículas virais e aumentar, significativamente, a quantidade de anticorpos. A Figura 4 representa 46,5% das amostras reagentes através dos métodos Elisa (Genscreen) e Fluorimetria (HIV DUO) que possuem carga viral em níveis baixos ( $\geq 80$  cópias de RNA do HIV/mL).

## CONCLUSÃO

Em nosso estudo, as aplicações das técnicas mostraram uma concordância em 100% dos casos, nos quais tivemos o cuidado de obter pacientes com carga viral tanto de baixa como elevada quantificação, possibilitando assim a boa sensibilidade dos métodos empregados, ELISA (Genscreen) e Fluorimetria (HIV DUO).

Pode-se ressaltar que pacientes, com acompanhamento da carga viral e que se mantêm em nível elevado, necessitam de uma maior atenção e realização da genotipagem, que permite a identificação de mutações no genoma do HIV, as quais, quando presentes, podem determinar resistência a agentes anti-retrovirais.

Pode-se verificar que a sensibilidade e especificidade dos métodos ELISA e Fluorimetria que se estudou fazem parte de uma nova geração de imunoenaios que reduzem o tempo significativamente da janela imunológica, representando um avanço tecnológico em diagnóstico para o controle do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

## REFERÊNCIAS

1. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. *Cellular and molecular immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000.
2. AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. Disponível em: <www.geocities.com>. Acesso em: 28 set. 2001.
3. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial. Disponível em: <www.saude.pr.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2001.
4. Bennett, J. C.; Plum, F. *Cecil: tratado de medicina interna*. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
5. Boom, R.; Sol, C. J. A.; van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503, 1990.
6. Burgard, M.; Rouzioux, C. O RNA-HIV plasmático ou carga viral do HIV. *NewsLab.* 36:96-110, 1999.
7. ELISA - Western Blot. Disponível em: <www.acssjr.hpg.ig.com.br/index.htm>. Acesso em 10 out. 2001.
8. Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
9. Figueiredo, M. S. Quantificação ultra-sensível do RNA do HIV-1- carga viral ultra-sensível. Disponível em: <www.fleury.com.br>. Acesso em: 2 out. 2001.
10. Kenten, J. H.; Gudibande, S.; Link, J.; Willey, J. J.; Curfman, B.; Major, E. O.; Massey, R. J. Improved electrochemiluminescent label for DNA probe assays: rapid quantitative assays of HIV-1 polymerase chain reaction products. *Clin. Chem.* 38:973-979, 1992.
11. Kerckhoven, V.; Vecauteren, G.; Piot, P.; van der Groen, G. Avaliação comparativa de 36 testes comerciais para detecção dos anticorpos contra o HIV-1. *Revista Laes&Haes.* 17:78-88, 1996.
12. Lacaz, C. S.; Martins, J. E. C.; Martins, E. L. *AIDS-SIDA*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Savier, 1990.
13. Manual da bioMérieux. Vidas. 1998.
14. Manual de treinamento: *NASBA amplification system*. [s.l.], [s.n.], [s.d.].
15. Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. *Microbiologia Médica*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Manole, 1999.
16. Mortensen, C. Acompanhamento laboratorial da terapêutica em pacientes com AIDS: da quantificação de carga viral a genotipagem por seqüenciamento automático. *NewsLab.* 36:90-94, 1999.
17. Pasteur, S. Relatório de avaliação Genscreen HIV 1/2 versão 2, 1998.
18. Seroferneker, M. L.; Pohlmann, P. R. *Imunologia básica e aplicada*. 1<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Sagra Lutzatto, 1998.
19. FUNASA. *Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS*. Disponível em: <www.funasa.gov.br>. Acesso em 2 out. 2001.
20. Van Gemen, B.; Van Beuning, R.; Kievits, T. A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J. Vir. Meth.* 49:157-168, 1994.
21. Veronesi, R.; Focaccio, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 1997.

Endereço para correspondência  
Dr<sup>ª</sup> Ana Conceição R. D. Saturnino  
Av. Bernardo Vieira, 4114/404 - Lagoa Nova  
59051-005 - Natal - RN

# Estudo retrospectivo de 145 casos de *Tinea capitis* na população de João Pessoa-Paraíba

## Retrospective study in 145 cases by *Tinea capitis* from the population in João Pessoa-Paraíba

Patrícia Marques Lima Pessoa de Aquino<sup>1</sup> & Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>2</sup>

**RESUMO** – Foram analisados 145 casos de pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa- PB, Brasil, com diagnóstico de *Tinea capitis* conforme idade, sexo, número de casos/ano e doenças associadas. Houve maior incidência no sexo feminino e na faixa escolar. A média de casos/ano foi de 14,5. Verificou-se associação de *Tinea capitis* com dermatite seborréica, *Tinea corporis* e pediculose.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Tinea capitis*, dermatofitose, epidemiologia.

**SUMMARY** – We studied 145 patients with *Tinea capitis* from Lauro Wanderley's University Hospital of Paraíba Federal University, João Pessoa-PB, Brasil, considering age, sex, number of cases/year and associated diseases. The most incidence were in females and in scholar age children. It was found association with seborreic dermatitis, *Tinea corporis* and pediculosis.

**KEYWORDS** – *Tinea capitis*, dermatophytosis, epidemiology.

### INTRODUÇÃO

As infecções produzidas por fungos, denominadas de micoses, constituem problema de Saúde Pública em nosso país, em decorrência de vários fatores: predomínio de clima tropical, grande extensão territorial, alta incidência da doença e baixa condição sócio-econômica da população<sup>2</sup>.

Dentre os diversos processos fúngicos, as dermatofitoses, que são micoses superficiais produzidas por um grupo de organismos conhecidos genericamente por dermatófitos, têm lugar de destaque. Esta condição determina o aparecimento de quadros clínicos diferentes em função do sítio anatômico: dermatofitose do couro cabeludo (*Tinea capitis*), dermatofitose do corpo (*Tinea corporis*), dermatofitose marginada (*Tinea cruris*), dermatofitose dos pés (*Tinea pedis*), dermatofitose ungueal (*Tinea unguium*), dermatofitose da face (*Tinea faciei*), dermatofitose das mãos (*Tinea manum*).

De ocorrência muito freqüente, a *Tinea capitis* pode ser adquirida a partir de homens e animais doentes e solos contaminados. São classificadas em tonsurantes, favo ou supuradas (*Kerion Celsi*). A forma clínica da tinea tonsurante difere quanto ao gênero do fungo causador: *Trichophyton* ou *Microsporum*.

As tinhas microspóricas do couro cabeludo apresentam-se clinicamente com lesão geralmente única, diâ-

metro de 5-6 cm, tonsurante, com fundo descamativo, pruriginosa; já as tinhas tricofíticas formam várias lesões tonsurantes no couro cabeludo, com diâmetros menores se comparadas às tinhas microspóricas (2-3 cm).

Quando o agente causal não é adaptado ao hospedeiro, isto é, usualmente se desenvolve no solo ou em animais, a lesão do couro cabeludo apresenta aspecto inflamatório intenso, com presença de pústulas, secreção purulenta e formação de tecido cicatricial. Essa lesão inflamada é conhecida como *Kerion Celsi*.

A mais grave das tinhas do couro cabeludo, pelas lesões também cicatriciais e alopecia definitiva, é a tinha favosa ou fávica, causada pelo *T. schoenleinii*, e microendêmica em áreas rurais ou comunidades de baixo nível sócio-econômico (tinha da miséria). Nesta, as lesões são pequenas, múltiplas, crateriformes e formam o clássico "godet". No entanto, outras formas clínicas com predomínio de lesão descamativa (pitiríí-de) ou com predomínio da lesão supurativa (impetigóide) podem ser observadas.

Diferentemente das tineas tonsurantes, a fávica persiste através dos anos até a fase adulta. Os adultos atuam como fonte de infecção para as crianças. Em recente trabalho, pesquisadores paraibanos detectaram 23,3% de incidência de dermatofitoses em João Pessoa. Destes casos, 29,6% correspondiam a tinhas do couro cabeludo<sup>1</sup>. Um estudo de 369 casos de der-

Recebido em 1/11/2001  
Aprovado em 28/02/2002

<sup>1</sup>Professora Assistente, UFPB; Aluna Doutorado Ciências da Saúde, UFPB; Médica do Ambulatório de Dermatologia do HU/UFPB.

<sup>2</sup>Professora Adjunta de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, UFPB.

matofitoses realizado em Vitória-ES encontrou apenas 10% de casos de *Tinea capitis*<sup>5</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foi realizada uma análise epidemiológica retrospectiva dos casos clinicamente diagnosticados como *Tinea capitis* no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba. Os dados que foram coletados correspondem ao período de abril de 1988 a maio de 1990 e de agosto de 1993 a dezembro de 1999. Trata-se de um estudo quantitativo de amostra única. O teste estatístico utilizado foi a proporção simples.

A amostra foi representada por 145 casos de *Tinea capitis*, ou seja, todos os pacientes com *Tinea capitis* registrados no período em estudo. Foram analisadas as seguintes variáveis: número de casos por ano, sexo, idade e doenças associadas. Os dados foram obtidos dos livros de registro de casos do ambulatório indicado. Não foram encontrados os livros de registros referentes ao período compreendido entre junho de 1990 e julho de 1993. É por esta razão que não incluímos os dados deste período no presente estudo.

## RESULTADOS

A Tabela I mostra a distribuição dos casos de *Tinea capitis* atendidos por ano no Hospital Universitário da UFPB. O ano de maior prevalência de *Tinea capitis* foi 1989 (15,9%), seguido de 1999 (13,8%).

A Tabela II mostra os casos de *Tinea capitis* distribuídos quanto à idade e sexo. Comparando-se as faixas etárias, nota-se maior número de casos na faixa escolar (50,3%), seguido da faixa pré-escolar (32,2%), que perfazem juntas 82,5% dos casos de *Tinea capitis*. O sexo feminino foi o mais acometido, com exceção da faixa pré-escolar. É interessante notar que, entre os adultos, 80% dos casos ocorreu no sexo feminino. Devemos levar em consideração que os pacientes atendidos no serviço público citado são, geralmente, de classe sócio-econômica baixa, não possuem plano de saúde e residem em João Pessoa ou em municípios do interior do Estado da Paraíba. Em São Paulo, estudo prévio revela incidência bem maior de *Tinea capitis* e demais dermatofitoses em pacientes atendidos em Hospital Geral do que em pacientes de consultório privado<sup>4</sup>.

A Tabela III revela a ocorrência de outras dermatopatias associadas à *Tinea capitis*: dois casos de *Tinea corporis*, dois de Dermatite Seborréica, um de Lúpus Eritematoso Discóide e um de Pediculose.

Na Tabela IV, vê-se a incidência, por ano, de *Kerion Celsi* dentro dos 145 casos revistos. Dentre as *Tinea capitis*, 11% apresentavam clinicamente aspecto inflamado (*Kerion Celsi*).

## DISCUSSÃO

Observamos, em nossa casuística, porcentagem de *Tinea capitis* equivalente nas faixas etárias de 0-2 anos (4,8%) e acima de 19 anos (4,1%), ressaltando que o

**TABELA I**  
Distribuição anual de *Tinea capitis*  
por ano nos 145 pacientes estudados

Ano	Casos	%
1988	11	7,6
1989	23	15,9
1990*	12	8,3
1993*	18	12,4
1994	16	11,0
1995	12	8,3
1996	12	8,3
1997	14	9,6
1998	7	4,8
1999	20	13,8
Total	145	100,0

\* Não houve como coletar dados no período de junho/90 a julho/93

**TABELA II**  
Distribuição de *Tinea capitis*  
por idade e sexo nos 145 pacientes estudados

Sexo Idade	Masc.	Fem.	Total
0-2 (lactente)	3	4	7 (4,8%)
3-6 (pré-escolar)	26	20	46 (31,8%)
7-12 (escolar)	25	49	74 (51,0%)
13-19 (adolescente)	5	7	12 (8,3%)
acima de 19 anos (adulto)	1	5	6 (4,1%)
Total	60	85	145(100,0%)

**TABELA III**  
Distribuição de dermatopatias associadas  
à *Tinea capitis* por ano nos 145 pacientes

Ano	Dermatopatias associadas
1988	1 ( <i>Tinea corporis</i> )
1989	1 (Pediculose)
1990	—
1993	1 (Lúpus Eritematoso Discóide)
1994	—
1995	—
1996	1 (Dermatite seborréica)
1997	1 ( <i>Tinea corporis</i> )
1998	1 (Dermatite seborréica)
1999	—
Total	6 (4,1%)

**TABELA IV**  
Número de casos de *Kerion Celsi*  
por ano nos 145 pacientes estudados

Ano	Número de casos
1988	2
1989	4
1990	3
1993	2
1994	2
1995	1
1996	2
1997	—
1998	—
1999	—
Total	16 (11,0%)

paciente mais jovem estava com 4 meses de nascido e o mais velho, com 38 anos. Porém, enquanto dentro do grupo dos lactentes não houve diferenças de acometimento quanto ao sexo, entre os adultos, notou-se o grande predomínio de casos no sexo feminino (83,3%). Este fato pode ser interpretado pelo contato maior do filho com a mãe, dentro do contexto familiar. Na faixa etária escolar, foram observados 51% dos casos, conforme padrão descrito na literatura médica brasileira<sup>1,2</sup>. A segunda maior incidência da doença se deu na faixa pré-escolar (31,8%).

O sexo feminino foi mais acometido em todas as faixas etárias, com exceção da pré-escolar. Furtado *et al.* já haviam registrado na literatura brasileira a maior prevalência da doença em sexo feminino, exceto na faixa pré-escolar (7 a 12 anos) na cidade de Manaus<sup>2</sup>.

A média de casos por ano foi de 14,5. Dentre os 145 casos estudados, dois apresentaram *Tinea corporis* associada, dois dermatite seborréica, um pediculose e um lúpus eritematoso discóide. Alerta-se para a importância da realização de exame micológico nos casos duvidosos de dermatite seborréica do couro cabeludo, porque pode tratar-se de *Tinea capitis* em estado inicial ou estar associada a esta patologia.

Não foi encontrado nenhum caso de *Tinea favosa*. Entretanto, houve 16 casos de Tinha inflamada (*Ke- rion Celsi*), número bem superior ao registrado em estudo realizado em São Paulo com 73 pacientes portadores de *Tinea capitis*<sup>3</sup>.

A importância do presente trabalho é oferecer dados que podem orientar na prevenção da doença na população paraibana. Enquanto na Bélgica e Holan-

da foram registrados 74 casos da doença de 1983 a 1992<sup>6</sup>, nosso estudo revela o atendimento em dobro do número de pacientes em 10 anos. A alta prevalência de *Tinea capitis* na população pesquisada pode ser um dos indicadores da premente necessidade de prevenção da doença. Maior atenção deve ser dispensada ao problema por parte das autoridades sanitárias do Brasil.

Os autores recomendam a realização de futuros estudos que investiguem a prevalência de *Tinea capitis* em pacientes de João Pessoa-PB.

## REFERÊNCIAS

1. Lima, E. O.; Pontes, Z. B. V. S.; Oliveira, N. M. C.; Carvalho, M. F. F. P.; Guerra, M. F. L.; Santos, J. P. Frequência de dermatofitoses em João Pessoa-Paraíba-Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 74(2):127-132, mar/abr, 1999.
2. Furtado, M. S. S.; Ihara, L. T.; Marója, M. F. *Tinea capitis* na cidade de Manaus-AM. *An. Bras. Dermatol.* 60(5):315-318, set/out, 1985.
3. Proença, N. G.; Assumpção, S. B. P. Dermatofitoses observadas em crianças com 0-12 anos de idade em São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21(3):146-148, maio-junho, 1979.
4. Proença, N. G.; Masetti, J. H.; Salebian, A.; Cucé, L. C. Flora dermatofítica e condições sócio-econômicas. *An. Bras. Dermatol.* 50:183-196, 1975.
5. Mattêde, M. G. S.; Coelho, C. C.; Mattêde, A. F.; Perin, F. C.; Júnior, L. P. Etiologia das dermatofitoses em Vitória-ES. *An. Bras. Dermatol.* 61(4):177-182, 1986.
6. Korstanje, J. M.; Staats, C. C. G. *Tinea capitis* in northwestern Europe 1963-1993: etiologic agents and their changing prevalence. *Intern. J. Dermatol.* 33(8):548-549, 1994.

Endereço para correspondência

Patrícia Marques Lima Pessoa de Aquino

Rua Flávio de Melo Uchoa 50/402 - Ed. Antônio E. Mendes - Bessa

João Pessoa - PB 58.037-100 - Fone: (0xx83) 246 6091

E-mail: fppaquino@uol.com.br



## Jubileu de Ouro da IFCC

Durante o XVIII Congresso Internacional de Química Clínica - ISCC, em Kioto, Japão, entre 20 e 25 de outubro de 2002, foi celebrado o Jubileu de Ouro da IFCC.

Fundada em 24 de julho de 1952, a entidade foi idealizada através do surgimento de entidades nacionais de química clínica que se organizaram e formaram um grupo internacional patrocinado pela IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Configurou-se de direito, durante o II Congresso Internacional de Bioquímica, realizado em Paris, em 1952, quando se formou na *International Federation of Clinical Chemistry* - IFCC. Em 1977, teve a sua expressão ampliada contemplando todas as áreas e aspectos do laboratório clínico: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

Inicialmente, a IFCC tinha por objetivo, o avanço do conhecimento e a promoção da bioquímica clínica em seus aspectos médico-clínicos, uma vez que seus laços permaneciam ligados à Comissão de Química Clínica da IUPAC, não obstante ser sabido que a IFCC se constituiria num órgão independente, passando assim, a ser somente um seu membro associado, o que afinal acabou sendo formalizado em 1967, permanecendo contudo, uma relação recíproca até 1998, quando foi dada por encerrada em virtude dos interesses e enfoques já não mais serem os da IFCC.

### Cronologia

- 1963/1967 - Estabelecimento de regras e estatutos da IFCC.
- 1967/1975 - Vínculo com a Organização Mundial de Saúde - OMS, como membro do Conselho Internacional de Organizações em Ciências Médicas.
- 1976/1984 - Criação de grupo especializado junto à Indústria de Diagnóstico; Início dos arquivos, diretrizes para a realização dos congressos, implementação do Programa de Professor Visitante (*Visiting Lecturer Program*); Criado o Reconhecimento Internacional por Serviços Distinguidos; Novo conceito para a Conferência Geral (*General Conference*), reunindo membros e delegados da IFCC num único encontro científico a cada três anos.
- 1982 - I Conferência Geral (*1<sup>st</sup> General Conference*) com associados e filiados internacionais.
- 1984 - Aprovação dos artigos que constituiriam a IFCC daí por diante.
- 1985 - Reorganização dos comitês.
- 1993 - Publicado o primeiro número do jornal da IFCC; Cooperação com outras associações e organismos na América Latina e Ásia.
- 1991/1996 - Criado o Plano Estratégico para dirigir a IFCC a partir do século XXI; Acordos com a Federação Européia de Sociedades

de Química Clínica (FESQC) e Confederação Latino-americana de Bioquímica Clínica (COLA-BIOCLI).

- 1997/1999 - Início do Plano Estratégico (áreas de estandarização e materiais de referência, incrementação na cooperação com organismos internacionais, além do estabelecimento do regulamento para eleição de um novo Conselho Executivo, entre outros); Diretrizes para acreditação de laboratórios clínicos em conjunto com a Associação Mundial de Patologia e Medicina de Laboratório (WASPaLM).

- 2000/2002 - Consolidação das atividades da IFCC; inauguração do escritório em Milão, Itália, além do site [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org); patrocínio de uma campanha mundial de controle do diabetes; elaboração de diretrizes para o programa de Boas Práticas do Laboratório Clínico, com a *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS); revisão de regras para realizar congressos internacionais (ICCC); criação do Programa de Intercâmbio Científico Internacional (*Professional Exchange Scientific Program*); publicação de assuntos e artigos científicos no *Journal of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (CCLM); criação de prêmios, além da realização de conferências de alto nível científico. Para as entidades filiadas à IFCC, particularmente a do Brasil, é motivo de grande satisfação estar presente nesse momento de evolução científico-cultural dessa entidade neste marco significativo.

# A leishmaniose tegumentar sob a perspectiva do paciente: resultado de uma prática educativa\*

## Cutaneous leishmaniasis under the patient's perspective: an educational practice result

M. T. G. Casavechia<sup>1</sup>; S. M. de Araújo<sup>2</sup>; J. J. V. Teixeira<sup>3</sup> & M. V. C. Lonardoní<sup>4</sup>

**RESUMO** – Foi realizado um estudo descritivo empregando a metodologia qualitativa entre portadores de leishmaniose tegumentar visando identificar a representação que a doença tem para o seu portador, antes e depois do tratamento e intervenção educacional. O estudo foi realizado de setembro de 2000 a março de 2001 no Estado do Paraná, Brasil. Para a coleta dos dados foi utilizada a entrevista semi-estruturada, sendo que os mesmos foram analisados pela técnica do discurso do sujeito coletivo. Foram destacadas as idéias centrais relacionadas com a etiologia da leishmaniose, sua transmissão/prevenção, gravidade, estigma, dificuldades do tratamento, sentimentos frente à doença e validade da educação em saúde. Este estudo evidenciou que o acompanhamento dos pacientes e as medidas educacionais são de fundamental importância para que o grupo social assumam um maior controle sobre sua saúde, auxiliando sobremaneira no enfrentamento da doença e seu tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE** – Leishmaniose tegumentar; metodologia qualitativa; discurso do sujeito coletivo; intervenção educacional; tratamento.

**SUMMARY** – A descriptive study was carried out among cutaneous leishmaniasis patients using the qualitative methodology, aiming to identify the role that the disease has to its sufferers both before and after treatment and educational intervention. The study was carried out from September 2000 to March 2001 in the state of Paraná, Brazil. For data collection it was used a semi-structured interview where the data was analysed by the collective subject's discourse technique. The central ideas regarding leishmaniasis etiology, its transmission/prevention, seriousness, stigma, treatment difficulties, feelings towards the disease and validity of health education, were highlighted. This study found that both patients' follow-up and educational measures are of fundamental importance for the social group's taking over of a better control of its own health, helping them face the disease and its treatment.

**KEYWORDS** – Cutaneous leishmaniasis; qualitative methodology; collective subject's discourse; educational intervention; treatment.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar, pela sua importância para a saúde pública, número crescente de casos, deformações e seqüelas que pode provocar e pelas dificuldades de tratamento, tem sido objeto de muitos estudos. É uma doença de alta prevalência no Brasil (Silva *et al.*, 1999) e segundo o Ministério da Saúde, nos últimos 20 anos vem apresentando franco crescimento no país, tanto em magnitude como em expansão geográfica (MS, 2000a). No Estado do Paraná esta dermatose tem sido notificada em diversos municípios, especialmente nas regiões norte e oeste, assumindo proporções epidêmicas em determinados períodos (Silveira *et al.*, 1996, 1999). Sua prevenção em programas verticais direcionados ao vetor ou ao reservatório tem esbarrado em dificuldades operacionais representadas pelas condições ambientais em que esta zoonose prevalece (Santos *et al.*, 2000).

Para que se obtenha êxito nas estratégias de prevenção das doenças endêmicas, é preciso que haja basicamente disponibilidade de recursos econômicos e, necessariamente, conhecimento das competências e atitudes da população diante do problema mórbido relevantes para a aceitação e participação efetivas da comunidade nas ações profiláticas (Santos *et al.*, 2000). Esta mesma idéia tem sido expressada por outros autores como Vásquez *et al.* (1991) e Marzochi & Marzochi (1994).

A conscientização frente a morbidade da doença é um processo que tem sido capaz de mobilizações da comunidade em ações sanitárias (Costa *et al.*, 1994), sendo que Noronha *et al.* (1995) apontam para a importância de se explorar os significados de uma enfermidade para um determinado grupo populacional.

A compreensão dos saberes, dos significados imaginários, dos sentimentos e atitudes do adoecido em face

Recebido em 20/6/2002

Aprovado em 12/7/2002

\*Trabalho realizado no Lab. de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) do Depto. de Análises Clínicas (DAC) da Univ. Est. de Maringá (UEM) – PR;

<sup>1</sup>Prof<sup>o</sup> da Disciplina de Parasitologia Clínica – DAC – UEM; <sup>2</sup>Prof<sup>o</sup> da Disciplina de Parasitologia – DAC – UEM;

<sup>3</sup>Farmacêutico doutorando do Curso de Saúde Pública – Departamento de Prática de Saúde Pública – USP;

<sup>4</sup>Prof<sup>o</sup> da Disciplina de Imunologia Clínica – DAC – UEM; Fonte financiadora – LEPAC.

da doença, possibilita a criação de novas formas de abordagem deste paciente, levando-se em consideração sua percepção. Como refere Minayo (1992), a metodologia qualitativa permite reconstruir as representações sociais de determinado grupo sobre temas específicos.

A modalidade de entrevista semi-estruturada, em pesquisa qualitativa na área da saúde, tem sido um método fundamental de coleta de dados pois ao mesmo tempo que valoriza a presença do investigador, oferece todas as perspectivas possíveis para que o informante alcance a liberdade e a espontaneidade necessárias, enriquecendo a investigação (Trivinos, 1987).

Com o objetivo de agir de forma mais efetiva para a prevenção e enfrentamento da leishmaniose, enquanto importante doença crônica, estigmatizante e de difícil tratamento, este trabalho busca identificar a representação que a leishmaniose tegumentar tem para o portador da mesma, antes e depois do tratamento e da intervenção educacional.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi desenvolvido um estudo descritivo qualitativo, numa amostra intencional de dez pacientes adultos portadores de leishmaniose tegumentar.

Os pacientes foram selecionados independentemente do sexo, entre os que, com suspeita de leishmaniose tegumentar, são rotineiramente encaminhados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e que apresentaram resultado de microscopia positivo para *Leishmania sp.* Os pacientes eram provenientes dos municípios de Maringá, Colorado, Paranacity, Sarandi e Marialva, Estado do Paraná, Brasil.

A todos estes pacientes foi feita uma explicação detalhada dos objetivos e da relevância para a saúde pública do estudo. Àqueles que se dispuseram a participar foi apresentado o termo de consentimento, garantindo-lhes sigilo e anonimato. Após a concordância e assinatura do mesmo, procedeu-se a entrevista.

Para a coleta dos dados foi utilizada a técnica da entrevista semi-estruturada pautada por um roteiro de questões, previamente testadas. Os discursos das entrevistas foram gravados por intermédio de um microgravador com fitas magnéticas de 60 minutos cada e dentro do menor tempo possível foram transcritos e digitados em forma literal.

Foram realizadas duas entrevistas com cada paciente em dois momentos distintos. A primeira foi realizada no momento em que o paciente veio ao LEPAC buscar os resultados dos exames laboratoriais e tomou consciência do resultado positivo para *Leishmania sp.* Após esta primeira entrevista, os pacientes receberam educação em saúde, envolvendo orientações e discussões acerca dos modos de transmissão e prevenção da leishmaniose tegumentar bem como para a importância do tratamento. Foi utilizado como material de apoio pedagógico, cartazes e folders. Na metade do tratamento os pacientes receberam visita domiciliar e nova intervenção educacional. A visita domiciliar possibilitou uma familiaridade com a realidade cotidiana do paciente, ampliando as possibilidades de uma ação educativa orientada.

Após a conclusão do primeiro esquema terapêutico que consiste em 10 a 20mg de antimonial pentavalente/kg/dia, durante 20 dias seguidos (MS, 2000a) e das intervenções educacionais, foi realizada a segunda entrevista. Todas as entrevistas foram desenvolvidas pelo próprio pesquisador no período de 4 setembro de 2000 a 18 de março de 2001.

Para o tratamento dos dados foi empregada a técnica de análise do discurso do sujeito coletivo (Lefèvre *et al.*, 2000) que consiste num conjunto de procedimentos de tabulação e organização de dados discursivos, onde foram utilizadas três figuras metodológicas a saber: a idéia central, as expressões-chave e o discurso do sujeito coletivo. Depois da transcrição literal, cada depoimento foi analisado extraindo-se as idéias centrais, que podem ser entendidas como a(as) afirmação(ões) que permite(m) traduzir o essencial do conteúdo discursivo explicitado pelos sujeitos em seus depoimentos. Em seguida foram identificadas as idéias centrais iguais ou equivalentes e suas respectivas expressões-chave, que são constituídas por transcrições literais de partes dos depoimentos que permitem o resgate do essencial do conteúdo discursivo. Finalmente as expressões-chave relacionadas às idéias centrais iguais ou equivalentes foram encadeadas discursivamente, como se houvesse apenas um indivíduo falando, compondo os discursos sínteses ou discursos do sujeito coletivo. Os discursos do sujeito coletivo apresentados foram confeccionados a partir de trechos selecionados dos depoimentos individuais aos quais se acrescentaram pequenos artifícios como a presença de conectivos entre parágrafos e a correção de alguns erros ortográficos grosseiros, apenas para efeitos didáticos.

O termo de consentimento e o roteiro da entrevista foram aprovados pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (MS, 2000b).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo desenvolveu-se a análise das idéias centrais e dos discursos do sujeito coletivo acerca da etiologia, transmissão, prevenção, tratamento da leishmaniose e validade da intervenção educacional de pacientes portadores da doença, antes e depois do tratamento e intervenção educacional sendo que os resultados estão apresentados nas Tabelas de I a VII.

Em relação ao que é leishmaniose (Tabela I) aparecem três idéias centrais, tanto antes quanto depois do tratamento e intervenção educacional: "vem do mosquito ou animais", "é grave" e "não sabe".

A primeira idéia central "vem do mosquito ou animais", antes do tratamento e educação em saúde, aponta para um sujeito coletivo que tem noções acerca dos elementos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar. Entretanto, no discurso, as idéias se mostram confusas e sem a clareza de como estes elementos se entrelaçam para fechar o ciclo:

*"É um mosquito que pica a gente e transmite o vírus... Uns falam que é uma doença que vem do rato, outros falam que*

*vem do macaco... o macaco tem tuberculose daí ele morre e a carne dele infecta e... dá isso aí! No lugar que a gente tá pegando é por causa do mato".*

É importante lembrar que a literatura sugere que o conhecimento popular sobre transmissão vetorial é frequentemente pobre em áreas endêmicas, aparecendo sempre uma série de explicações alternativas para a transmissão (Evans *et al.*, 1993; Aikens *et al.*, 1994; Williams-Blangero, *et al.*, 1999).

Após a educação em saúde do sujeito coletivo adquire a capacidade de síntese do discurso com clareza de idéias e objetividade:

*"Leishmaniose é transmitida pelo mosquito, que vem através dos animais. É um mosquito bem perigoso".*

Com a intervenção educacional buscou-se introduzir algum conhecimento científico, no sentido de desmistificar conceitos vagos, difusos ou inverídicos, como afirma Falavigna *et al.* (2000). Este fato pode ser melhor entendido conforme relatos de Dryden & Vos (1996) que afirmam que aprendemos 10% do que lemos, 15% do que ouvimos e 80% do que vivenciamos.

Na segunda idéia central "é grave", o sujeito coletivo que ainda não passou pela doença, tende a minimizar sua importância e gravidade apesar de afirmá-la:

*"Ah... leishmaniose é grave. É uma coisa bem estranha, dolorosa, difícil de tratar."*

Said (1984) e Andrade & Coelho (1997) apontam para o fato de que a dimensão concedida a um problema se relaciona com as concepções acerca do mesmo que por sua vez, guardam estreita relação com sua vivência.

Após a doença, percebe-se um sujeito coletivo convicto das dificuldades relacionadas à doença e ao tratamento, mencionando inclusive o estigma que a cerca:

*"... leishmaniose é um pesadelo... te deixa meio nervoso. Porque todo mundo pergunta o quê que é isso e você tem que ficar explicando..."*

Costa *et al.* (1987) já chamavam a atenção para o fato da leishmaniose ser uma doença estigmatizante pelas lesões e seqüelas e que pode produzir, no decorrer de sua evolução, fenômenos psicossociais.

A persistência do sujeito coletivo que não consegue conceituar a leishmaniose, mesmo após a vivência da doença e a educação em saúde, aponta para o fato de que conhecimentos técnicos não são facilmente incorporados, particularmente por indivíduos de baixo nível sócio-cultural e que sequer tinham os conhecimentos populares. Esta observação encontra suporte em Vasconcelos (1998), que afirma que a experiência de educação popular no setor saúde é um processo demorado e extremamente exigente de investimento profissional.

Quanto aos mecanismos de transmissão (Tabela II), surge apenas uma idéia central tanto antes quanto após a educação em saúde e tratamento: "através do vetor/meio ambiente". Já no primeiro discurso, percebe-se conhecimentos epidemiológicos sobre a transmissão da doença e sua profilaxia. Entretanto, existem lacu-

nas em como usar estes conhecimentos para a efetiva profilaxia. Novamente falta para este sujeito coletivo a noção da real posição dos elos da cadeia epidemiológica da doença (Williams-Blangero *et al.*, 1999).

*"O que eu vejo dizer, é que é um mosquito... infectado. Conforme tem muita água parada... rios, matas úmidas, lugar poluído. Eu acho também que de alguma criação, assim que deve tá infectada que se aproxima e vem até a gente".*

Após receber a educação em saúde surge um discurso com idéias mais claras e objetivas, definindo com mais clareza o papel do vetor e dos reservatórios domésticos na cadeia de transmissão:

*"Pega através do mosquito contaminado. Pode ser que o mosquito mordeu um animal que já esteja contaminado, cachorro, e pode passar para o ser humano".*

Acerca do que pode ser feito para evitar a leishmaniose, (Tabela III) surgiram nos dois momentos da entrevista duas idéias centrais: "sabe alguma maneira" e "não sabe". Da primeira idéia central, antes do tratamento, evidenciou-se um sujeito coletivo que conhece algumas maneiras de prevenção da leishmaniose mas que se revela com certo pessimismo em relação à elas:

*"Mas vai fazer o quê? Pode ser picado até em casa!...vai virar uma epidemia".*

No entanto, após a intervenção educacional e tratamento, o sujeito coletivo sabe que é possível fazer alguma coisa e as medidas preventivas são permeadas por uma certeza de que se bem conduzidas, podem dar certo:

*"Ah sim... precauções. Usar repelente, telinha, veneno. Usar roupa de manga comprida. Não ficar frequentando beira de rios, matas, lugares sujos. Evitar de ir pescar... Porque se não fizer, não tem condições de parar com esses problemas desses mosquitos."*

A segunda idéia central "não sabe", mesmo depois do tratamento e educação em saúde, expressa novamente o sujeito coletivo que tem dificuldades para incorporar os conhecimentos técnicos.

Podemos constatar também que é difícil separar o discurso da transmissão e da prevenção. As maneiras de transmissão emergem entrelaçando as medidas preventivas colocando em destaque que a distinção desses aspectos é algo próprio do modelo explicativo das ciências da saúde mais não da concepção popular (Noronha *et al.*, 1995).

Acerca dos sentimentos frente ao diagnóstico positivo para *Leishmania sp* (Tabela IV), surgiram duas idéias centrais antes do tratamento e intervenção educacional. No primeiro discurso o sujeito está bastante triste e preocupado com todas as questões inerentes à doença e seu tratamento:

*"Me sinto assim bastante triste. O tratamento é prolongado... a gente perde tempo se preocupando com o problema, que pode ser curado, mais é realmente tempo da sua vida que você perde!"*

No segundo discurso o sujeito expressa sentimentos de confiança, ou por acreditar na medicina, ou pelo alívio de ter seu diagnóstico elucidado:

*"Eu estou tranqüilo. Porque já faz uns três ou quatro meses que eu estou com a doença e não estava sabendo o que era. Agora eu estou sabendo o que que é, prá poder tratar... a gente acredita muito nos médicos, na medicina..."*

Ao ser aplicada a mesma pergunta relativa aos sentimentos, pós-tratamento e educação em saúde, surgiu uma única idéia central que se expressa num discurso em que o sujeito se mostra sossegado, tranqüilo, mas que não deixou de mencionar o quanto o tratamento foi difícil e doloroso:

*"Ah... agora sim. Agora estou me sentindo bem... sossegado... tranqüilo. Acabou aquele apavoramento. Essa injeção é forte e ela me baqueou bastante. Doía muito. Mais depois que acabou as injeções, eu estou me sentindo ótimo. Graças a Deus já passou!"*

Roberto *et al.* (1997) já apontavam para as dificuldades de tratamento, como o elevado número de ampolas prescritas por paciente e os graves efeitos colaterais bem como ausência de recursos humanos qualificados para o seu acompanhamento. Esta situação tem ocasionado grande sofrimento aos pacientes aliada ao fato de ser uma doença de longa duração, requerendo meses e algumas vezes anos para a sua completa remissão.

Em relação à questão de ter sido afetado o relacionamento familiar ou de amizades por causa da doença (Tabela V) surgem duas idéias centrais distintas, antes e depois do tratamento e intervenção educacional. O primeiro discurso coletivo aponta para um sujeito que não encontra problemas de relacionamento com parentes e amigos pelo fato de estar com a leishmaniose. É interessante que este sujeito, mesmo antes de receber a educação em saúde, tinha conhecimentos de como a doença era transmitida, demonstrando ser patente o benefício estabelecido pelo conhecimento na qualidade de vida, mesmo de um indivíduo portador de doença crônica estigmatizante:

*"...ninguém ficou com medo porque as pessoas sabem, que essa doença é transmitida só pelo mosquito".*

Segundo Dias (1998), a aquisição de informação contribui para o aumento da auto-estima e exercício da cidadania.

A segunda idéia central evidencia um sujeito coletivo que sente o preconceito e os fenômenos psicossociais que as lesões estigmatizantes produzem no decorrer de sua evolução, particularmente quando em regiões expostas:

*"...quando eu saio na rua as pessoas olham...às vezes eu acho esquisito que todo mundo pergunta o que que é. Porque é no rosto, é exposto. É esquisito, é estranho!"*

Magalhães *et al.* (1990) admitem que a ignorância de aspectos importantes da doença, principalmente do caráter não contagiante da mesma, determina a atitude de rejeição.

Quanto ao conhecimento sobre o tratamento da leishmaniose (Tabela VI), no primeiro momento da entrevista, convém salientar a ênfase do sujeito coletivo que sabe que são muitas injeções, que são dolorosas e que o tratamento tem que ser feito para se obter a cura. Netto *et al.* (1985) em uma investigação a respeito do que pensa a população sobre vários aspectos da leishmaniose, afirma que em termos de tratamento as injeções foram fortemente mencionadas. No entanto, o tratamento ainda não é conhecido de todos, pois na segunda idéia central aparece o discurso do sujeito coletivo que não tem conhecimento sobre o tratamento da doença.

No segundo momento da entrevista, após a conclusão do tratamento, o tema abordado foi a motivação para o término deste, a despeito das inúmeras dificuldades. Surgiram duas idéias centrais. A primeira, "tratamento completo motivado pelo medo das complicações", evidencia um sujeito coletivo consciente da importância do tratamento. O medo, aliás, surge porque ele tem conhecimento das complicações que ocorrerão, caso ele não faça o tratamento corretamente:

*"...o medo da doença que é muito braba. Se você não cuidar, pode virar até uma doença mais gravíssima. Pode até, sei lá, perder uma perna. Eu não quero prá mim!"*

A segunda idéia central, "tratamento completo motivado pelas orientações", aponta a presença de um sujeito coletivo também consciente, mas que incorporou as orientações e se apegou à elas para finalizar o tratamento, mesmo com todas as dificuldades:

*"...é a orientação, as explicações. Foi pedido que a gente faça um tratamento certinho, se deixar complica mais. Vale a pena! A saúde em primeiro lugar!"*

Somente ao final do tratamento, os pacientes foram abordados com uma questão de avaliação do trabalho do qual eles haviam participado (Tabela VII). Surge desta questão uma única idéia central num discurso coletivo que enfatiza a importância da orientação para a conscientização e enfrentamento da doença e tratamento:

*"...me conscientizei que eu tinha que fazer o tratamento certo prá poder sarar. Me ajudou a ser persistente. A gente ficou mais positivo, com um pensamento melhor. A orientação vale muito, tira o medo da gente."*

Segundo Vasconcelos (1998), as práticas educativas inseridas na dinâmica social local têm sido dinamizadas para o enfrentamento de quadros de adoecimento. O processo educativo é uma forma de encorajamento e apoio para que as pessoas e grupos sociais assumam um maior controle sobre sua saúde e suas vidas. É também o ponto de partida para a tomada de consciência e incorporação de hábitos preventivos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa aponta para a necessidade da sistematização de projetos de educação para a saúde em níveis mais abrangentes. No caso específico dos por-

**IDÉIA CENTRAL E DISCURSO DO SUJEITO COLETIVO ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO E INTERVENÇÃO EDUCACIONAL DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE EM RESPOSTA ÀS PERGUNTAS, RESPECTIVAMENTE**

**TABELA I**  
**“O que é leishmaniose para o(a) senhor(a)?”**

Antes do tratamento		Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Vem do mosquito ou animais</b>	<i>Vem do mosquito ou animais. É um mosquito que pica a gente e transmite o vírus e atrapalha muito a saúde da gente. É um mosquito muito perigoso por causa que se não tratar... depois com o tempo acaba reconhecendo no nariz, ou na boca ou na língua. Então é um problema sério, isso aí! Uns falam que é uma doença que vem do rato, outros falam que vem do macaco, outros falam que vem da cobra. Da febre deles, né! Diz que é tirada da tuberculose... o macaco tem tuberculose daí ele morre e a carniça dele infecta e... dá isso aí! No lugar que a gente tá pegando, é por causa do rato.</i>	<b>Vem do mosquito ou animais</b>	<i>Leishmaniose é transmitida pelo mosquito, que vem através de animais. É um mosquito assim... bem perigoso, que eu não quero ter o prazer de receber a picada novamente.</i>
Idéia central (2)	Discurso do sujeito coletivo (2)	Idéia central (2)	Discurso do sujeito coletivo (2)
<b>É grave</b>	<i>Ah... leishmaniose é grave. Eu acho que tem que ser tratada. Foi a primeira vez que eu vejo uma doença no meu corpo assim grave. É uma coisa bem estranha, dolorosa, difícil de tratar também.</i>	<b>É grave</b>	<i>Leishmaniose é um problema sério. O pior de tudo é o remédio, que é muito doído. É um problema difícil pra tratar. É uma doença perigosa por causa que tem que tratar bem tratado e fazer o regime certo. Incomoda muito a gente. Então o bom seria se a gente ficasse sem isso que é brabo, né! Leishmaniose é um pesadelo. A gente sempre fica com medo, né! É uma doença que preocupa bastante a gente. Leishmaniose é um negócio que, às vezes te deixa meio nervoso. Porque todo mundo chega em você e pergunta que é isso? E você tem que ficar explicando, entende? Então eu acho que é uma coisa assim incômoda, tanto pra mim como para o meu sistema nervoso.</i>
Idéia central (3)	Discurso do sujeito coletivo (3)	Idéia central (3)	Discurso do sujeito coletivo (3)
<b>Não sabe</b>	<i>Ah... isso eu não tenho a menor idéia. Eu não sei o que é. Já tinha ouvido falar, mas... nunca tinha parado pra pensar sobre a doença. Nunca esperava que eu pegaria a doença.</i>	<b>Não sabe</b>	<i>Ah... isso aí eu não sei responder não!</i>

**TABELA II**  
**“Como o(a) senhor(a) acha que se pega esta doença?”**

Antes do tratamento		Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Através do vetor/meio ambiente</b>	<i>O que eu vejo dizer, é que é um mosquito... infectado. Diz que é um tal de asa de palha. Conforme tem água... muita água parada... isso aí que junta o mosquito, né? A informação que eu tive é em rios, matas úmidas, lugar poluído. E... inclusive tem rios afetados na região. A gente tem que tomar muito cuidado, usar repelente quando for pescar, né! Esse tipo de coisa. Tomar certos tipos de precaução, porque eu acho que nunca iria acontecer comigo e aconteceu, então pode acontecer com muita gente. Bom, eu acho também que de alguma criação, assim que deve tá infectada que se aproxima e vem até a gente. Essa doença se pega... como eu mesmo peguei no serviço, trabalhando à noite. Senti a coceira no braço e aí depois, com três dias eu cocei e saiu aqueles caroços. Foi trabalhando.</i>	<b>Através do vetor/meio ambiente</b>	<i>Pega através do mosquito contaminado. Pode ser que o mosquito mordeu um animal que já esteja contaminado, cachorro, e pode passar para o ser humano, né! Como eu fiquei sabendo, é pegado em beira de rios, que é um foco, em lagoas, matas úmidas, onde tem muitas árvores no escuro, lugares sujos. Mas eu acho que mais em beira de rio, à tardinha, pescando. Eu sem tá pescando peguei isso, no meu serviço. É só a gente às vezes facilitar um pouco, não tomar as medidas certas que deve tomar, né!</i>

**TABELA III**  
**“O(A) senhor(a) tem idéia do que fazer para evitar a leishmaniose?”**

Antes do tratamento		Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Sabe alguma maneira</b>	<i>Olha... o que eu faço sempre assim pra prevenir, a gente passa repelente, né! Sempre passa, mas assim mesmo esse não respeitou nem o repelente! E... usar roupas compridas, de manga longa. Calçados ideais, esse tipo de coisa, né! Não manter animais em casa. Quintal muito limpo, galinheiro. Quanto mais limpeza melhor! O que a gente pode se aplicar... é de ficar em casa. Isso aí deve evitar. Mas vai fazer o que? Pode ser picado até em casa! Eu acho que se continuar, vai virar uma epidemia.</i>	<b>Sabe alguma maneira</b>	<i>Ah, sim...precauções, né! Usar repelente, telinha, veneno. Usar roupa de manga comprida. Não ficar frequentando muito beira de rios, matas, lugares sujos. Evitar de ir pescar nos horários, à tarde e de manhã cedo. Acho que a gente pode evitar assim: passar veneno na cidade, nessas lagoa aí que estão tudo infectada. Porque se não fizer, não tem condições de parar com esses problemas desses mosquito aí! Mais limpeza!</i>
Idéia central (2)	Discurso do sujeito coletivo (2)	Idéia central (2)	Discurso do sujeito coletivo (2)
<b>Não sabe</b>	<i>Não, eu não tenho idéia, eu não sei como evitar. De jeito nenhum.</i>	<b>Não sabe</b>	<i>Não tenho idéia, não!</i>

tadores de leishmaniose tegumentar, suas concepções depois da intervenção educacional revelaram a importância do seu acompanhamento e da conscientização para o enfrentamento da doença e tratamento. Estes dados podem nortear novas formas de abordagem aos pacientes portadores de doenças crônicas, em sintonia com os princípios do Programa Saúde da Família (MS, 1994) de priorizar as ações de proteção e promo-

ção à saúde dos indivíduos de forma integral e contínua. Por essa perspectiva reiteramos o que afirma Rocha (2000): “conscientização é um processo que permite ao homem compreender a realidade que o cerca, como ela se estrutura, o que ele é e a reagir a essa realidade, assumindo seu destino e dos seus semelhantes com autonomia, buscando sempre melhores condições de vida”.

**IDÉIA CENTRAL E DISCURSO DO SUJEITO COLETIVO ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO E INTERVENÇÃO EDUCACIONAL DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE EM RESPOSTA ÀS PERGUNTAS, RESPECTIVAMENTE**

**TABELA IV**  
**“Como o(a) senhor(a) está se sentindo sabendo que está/esteve com a Leishmaniose?”**

Antes do tratamento		Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Sentimentos de preocupação</b>	<i>Me sinto assim... bastante triste, com medo dela atacar e a gente não poder trabalhar. O tratamento é prolongado e a gente perde tempo se preocupando com o problema, que pode ser curado, mais é realmente tempo da sua vida que você perde! E também pode servir como um aprendizado, né! A gente aprende que na vida não é só saúde, também a gente passa por problemas! A gente fica meio desapontado, porque o tratamento disso aí é complicado. Tem que tomar muita injeção, né! Tem que tratar, se Deus quiser, sara.</i>	<b>Sentimentos de preocupação</b>	<i>Ah... agora sim. Agora estou me sentindo bem, sossegado tranquilo. Acabou aquele apavoramento. No início eu senti bem mal, eu estava muito preocupado mesmo, que eu via que aquilo estava comendo meu pé. Essa injeção é forte e ela me baqueou bastante, me derrubou bem. Doía muito... todo o corpo, nas juntas, tudo que você pensar dói! Mais depois que acabou as injeções, eu estou me sentindo ótimo, graças a Deus!</i>
<b>Idéia central (2)</b>	<b>Discurso do sujeito coletivo (2)</b>		
<b>Sentimentos de tranqüilidade</b>	<i>Eu estou tranqüilo. Porque já faz uns três ou quatro meses que eu estou com a doença e não estava sabendo o que era. Agora eu estou sabendo o que é, prá poder tratar, então, eu estou tranqüilo. Eu estou bem porque a gente acredita muito nos médicos, na medicina.</i>		

**TABELA V**  
**“Foi afetado seu relacionamento familiar ou de amizades por causa da doença?”**

Antes do tratamento		Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Não foi afetado nenhum tipo de relacionamento</b>	<i>Não de jeito nenhum. Ninguém ficou com medo porque as pessoas sabem, que essa doença é transmitida, só pelo mosquito. Não pode é deixar ficar assim muito tempo com ela, que pode passar no sangue da gente.</i>	<b>Não foi afetado nenhum tipo de relacionamento</b>	<i>Não. Tudo normal. Problema nenhum porque a gente estava com essa mordida de mosquito aí. Não dá problema com vizinho ou parente, não! O pessoal não tem cisma disso aí.</i>
<b>Idéia central (2)</b>	<b>Discurso do sujeito coletivo (2)</b>	<b>Idéia central (2)</b>	<b>Discurso do sujeito coletivo (2)</b>
<b>Sente preconceito</b>	<i>Eu me sinto assim, quando eu saio na rua, que às vezes as pessoas olham, né! E... às vezes eu acho esquisito que todo mundo pergunta o que que é. Porque é no rosto, é exposto. Então é esquisito sabe! É estranho!</i>	<b>Sente preconceito</b>	<i>Quando eu fui no Posto de Saúde teve pessoas lá, que achou que isso aqui fosse que nem AIDS. Que era contagioso! Tem gente que sente preconceito, mas não são todos, não!</i>

**TABELA VI**  
**(a) “O(A) senhor(a) sabe alguma coisa a respeito do tratamento desta doença?” e (b) “O quê o motivou a finalizar o tratamento?”**

(a) Antes do tratamento		(b) Depois do tratamento e intervenção educacional	
Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)	Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>Sabe algo</b>	<i>Eu sei que tem que tomar um monte de injeção, né! E que deve ser tratada o mais rápido possível e com medicamentos ideais e serem tomados com responsabilidade, né! É isso que eu sei. Se você faz o tratamento certinho você é curado.</i>	<b>Tratamento completo motivado pelo medo das complicações</b>	<i>O medo da doença que é muito braba! Medo que eu tive de às vezes fazer pela metade e depois voltar a doença. E eu ficar com aquilo na cabeça, pensando que foi por causa que eu parei pela metade. O risco, porque de repente é uma doença que se você não cuidar, pode virar até uma doença mais gravíssima, né! Pode até perder uma perna. Porque eu já vi pessoas que ficou feio, coisa horrível, né! Eu não quero prá mim. O importante é sarar, viver bem!</i>
<b>Idéia central (2)</b>	<b>Discurso do sujeito coletivo (2)</b>	<b>Idéia central (2)</b>	<b>Discurso do sujeito coletivo (2)</b>
<b>Não sabe</b>	<i>Não, não sei de nada. Como se trata, como que não.</i>	<b>Tratamento completo motivado pelas orientações</b>	<i>Muito bem, completei direitinho, não falhou um dia de tratamento! A gente fez aquilo que foi pedido, né! É a orientação, as explicações, porque foi pedido que a gente faça um tratamento bonito, prá ter saúde mais rápido! Tem que fazer certinho, porque se deixar, complica mais. Então mesmo que a gente passa apurado um pouquinho, mais vale a pena! A saúde em primeiro lugar!</i>

**TABELA VII**  
**“Qual a sua opinião a respeito deste tipo de trabalho do qual o(a) senhor(a) participou?”**

Idéia central (1)	Discurso do sujeito coletivo (1)
<b>É um bom trabalho/me conscientizou</b>	<i>É um ótimo trabalho porque pelo menos conscientiza um pouco quem já passou e quem tá passando agora, né! Fica consciente realmente da doença que é. Hoje eu posso passar prá pessoas o que é leishmaniose. Ele me conscientizou que eu tinha que fazer o tratamento certo prá poder sarar. Eu acho muito importante! Me ajudou a ser persistente e eu fiquei com medo, porque o que eu vi naquele papelzinho de leishmaniose, o nariz do rapaz defasado, nossa... aquilo me deixou amedrontado. Prá mim tem que ser feito, isso aí tem que continuar E o principal são as autoridades se juntarem e fazer um trabalho melhor, de limpeza, entendeu? Eu acho que isso aqui um dia pode acabar! Assim conversando a gente vai se entendendo, vai aprendendo mais, todo mundo participa junto. A pessoa vai explicando e a gente vai ficando mais atento prá coisas. Isso aí é que foi o mais importante. Ah...também o que ajudou é que a gente ficou melhor, assim, ficou mais positivo, com um pensamento melhor. A orientação vale muito! A gente fica mais tranqüilo, graças a Deus! Tira o medo da gente!</i>

## REFERÊNCIAS

1. Aikens, M. K.; Pickering, H.; Greenwood, B. M. Attitudes to malaria, traditional practices and bednets (mosquito nets) as vector control measures: A comparative study in five West African countries. *J. Trop. Med. Hyg.* 97:81-86, 1994.
2. Andrade, V.; Coelho, M. A. S. M. O processo educacional na promoção de ações comunitárias em Saúde. *Rev. Bras. Cancerol.* 43:57-63, 1997.
3. Costa, J. M. L.; Vale, K. C.; Cecílio, I. N.; Osaki, N. K.; Netto, E. M.; Tada, M. S.; França, F.; Barreto, M. C.; Marsden, P. D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20:77-82, 1987.
4. Costa, J. M. L.; Vale, K. C.; França, F.; Costa, M. A. F.; Silva, J. O.; Lago, E. L.; Marsden, P. D. A leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica como fator de mobilização comunitária. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27:255-257, 1994.
5. Dias, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 14 (supl. 2): 19-37, 1998.
6. Dryden, G.; Vos, J. *Revolucionando o aprendizado*. São Paulo: Makron Books do Brasil Editora Ltda. 500p. 1996.
7. Evans, D. B.; Gelband, H.; Vlassoff, C. Social and economic factors and the control of lymphatic filariasis: a review. *Acta Trop.* 53:1-26, 1993.
8. Falavigna, D. L. M.; Guilherme, A. L. F.; Araújo, S. M.; Pupulim, A. R. T.; Dias, M. L. G. G.; Marcondes, N. R. Formação de agentes multiplicadores em doenças parasitárias. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 32:53-55, 2000.
9. Lefèvre, F.; Lefèvre, A. M. C.; Teixeira, J. J. V. *O discurso do sujeito coletivo: uma nova abordagem metodológica em pesquisa qualitativa*. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul. 140p. 2000.
10. Magalhães, H. M. T. V.; Costa, J. M. L.; Costa, R. M.; França, F.; Vale, K. C.; Marsden, P.; Magalhães A. V. Mudança do componente cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 23:49-52, 1990.
11. Marzochi, M. C. A.; Marzochi, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública.* 10 (Supl. 2): 359-375, 1994.
12. Minayo, M. C. S. *O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em Saúde*. 4ª Ed. São Paulo: Editora Hucitec. 263 p. 1992.
13. MS (Ministério da Saúde). *Saúde dentro de casa. Programa de Saúde da Família*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. 1994.
14. MS (Ministério da Saúde). *Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana*. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. 2000a.
15. MS (Ministério da Saúde). *Normas para pesquisa envolvendo seres humanos*. Brasília: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. 2000b.
16. Noronha, C. V.; Barreto, M. L.; Silva, T. M.; Souza, I. M. Uma concepção popular sobre a esquistossomose mansônica: os modos de transmissão e prevenção na perspectiva de gênero. *Cad. Saúde Pública.* 11:106-117, 1995.
17. Netto, E. M.; Tada, M. S.; Golightly, L.; Kalter, D. C.; Lago, E.; Barreto, A. C.; Marsden, P. D. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18:33-37, 1985.
18. Roberto, A. C. B. S.; Lima, A. P.; Peixoto, P. R.; Misuta, N. M.; Fukushigue, Y.; Ferreira, M. E. M. C.; Nerilo Sobrinho, A.; Silveira, T. G. V.; Teodoro, U. Avaliação da terapia com antimoniatado de N-metil-glucamina e de notificação de leishmaniose tegumentar. *An. Bras. Dermatol.* 72:129-136, 1997.
19. Rocha, M. P. C. A questão cidadania na sociedade da informação. *Ci. Inf.* 29:40-45, 2000.
20. Said, R. V. A. *A percepção popular da leishmaniose tegumentar americana*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 1984.
21. Santos, J. B.; Lauand, L.; Souza, G. S.; Macêdo, V. O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 16:701-708, 2000.
22. Silva, N. S.; Viana, A. B.; Cordeiro, J. A. & Cavasini, C. E. Leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 33:554-559, 1999.
23. Silveira, T. G. V.; Teodoro, U.; Lonardoni, M. V. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 12:141-147, 1996.
24. Silveira, T. G. V.; Arraes, S. M. A. A.; Bertolini, D. A.; Teodoro, U.; Lonardoni, M. V. C.; Roberto, A. C. B. S.; Ramos, M.; Nerilo Sobrinho, A.; Ishikawa, E.; Shaw, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32:413-423, 1999.
25. Trivinos, A. N. S. *Introdução à pesquisa em ciências sociais: a pesquisa qualitativa em educação*. São Paulo: Editora Atlas. 175p. 1987.
26. Vasconcelos, E. M. Educação popular como instrumento de reorientação das estratégias de controle das doenças infecciosas e parasitárias. *Cad. Saúde Pública.* 14(Supl. 2):39-57, 1998.
27. Vásquez, M. L.; Kroeger, A.; Lipowsky, R.; Alzate, A. Conceptos populares sobre la leishmaniasis cutánea en Colombia y su aplicabilidad en programas de control. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 110:402-415, 1991.
28. Williams-Blangero, S.; Vandeberg, J. L.; Teixeira, A. R. L. Attitudes towards Chagas' disease in an endemic Brazilian community. *Cad. Saúde Pública.* 15:7-13, 1999.

Endereço para correspondência

Maria Teresinha Gomes Casavechia

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas

Av. Colombo, 5790, zona 07 – 87020-900 Maringá – PR

E-mail: mtgcasavechia@uem.br

*Saiba o que é preciso para ter o seu*

## Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

As provas para a concessão do Título de Especialista em Análises Clínicas, outorgado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, são aplicadas durante a realização dos congressos ou quando programadas pelas regionais e delegacias da SBAC.

Conheça as normas do regulamento para a concessão desse título, através do telefone (0xx21)2264-4449, pelo fax (0xx21)2204-0245 ou pelo e-mail: [teac@sbac.org.br](mailto:teac@sbac.org.br)