

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Determinação de nitritos em alimentos cárneos	3
<i>Francisco Afrânio Cunha; Teresa M. de Jesus P. Carvalho; Everardo Albuquerque Menezes; Micheline Soares C. Oliveira; Petrônio Augusto S. Souza; Alexandra Fernandes Pereira & Aurelice Barbosa de Oliveira</i>	
Nitrite's determination in food contents meat	
<i>Prêmio Newprov</i>	
Estudo comparativo dos resultados obtidos pelos métodos de imunocromatografia e o ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-vírus dengue	5
<i>Fábio Carmona de Jesus Maués; Suelli Guerreiro Rodrigues & Márcio Roberto Teixeira Nunes</i>	
Comparative study of the results obtained by immunocromatography methods and ELISA IgM and IgG antibodies detection antidengue virus	
Avaliação bioquímica e hematológica da 1ª turma feminina de cadetes da Academia da Força Aérea Brasileira	11
<i>Alexandre Elias Cosendey; Maria Suzana de Moraes; Ana Paula de Souza Diniz & Claudio Fernández Araujo</i>	
Biochemical and hematological evaluation from the 1 st female cadet division of Brazilian Air Force Academy	
Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA™120) para contagem de reticulócitos	17
<i>Rafael Noel Moresco; Matheus Pereira Valente; Luis Cláudio Rosa Vargas; Sérgio Luis Coletto; Liana Morari; Rosana Mancuso Defferrari & Rejane Pan Becker</i>	
Comparative analysis of manual and automated (ADVIA™120) reticulocytes counting	
<i>Prêmio UFRJ - Análises Clínicas</i>	
Influência do estresse nos níveis sanguíneos de lipídios, de ácido ascórbico, de zinco e de outros parâmetros bioquímicos	19
<i>G. E. Ronsein; R. L. Dutra; E. L. Silva; F. Martinello; E. M. Hermes; G. Balen; S. Jorge; C. D. A. Waltrick; C. S. M. Silva; B. M. Santos; V. Leal; R. U. Queiróz & G. A. Cantos</i>	
Stress' influence on blood levels of lipid, ascorbic acid, zinc and other biochemical parameters	
Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário	27
<i>R. C. V. Santos; A. Lunardelli; T. A. Castaman; F. B. Nunes; M. G. S. Pires; J. R. Oliveira & P. H. Wachter</i>	
Prevalence and antimicrobial susceptibility in urinary tract pathogens	
<i>Prêmio UFRJ - Citologia</i>	
Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papilomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR	29
<i>Edilson Nobuyoshi Kaneshima; Linda Emiko Suzuki; Mary Mayumi Taguti Irie; Celina Shizue Yoshida; Sônia Francieli Maia da Silva & Marcia Edilaine Lopes Consolaro</i>	
The application and its mportance in non-classic morphologic approaches to cytopathology diagnostic of Human Papillomavirus (HPV) previously detected for PCR	
Diagnóstico laboratorial da tuberculose na cidade do Rio Grande, RS, Brasil	35
<i>Maria Marta Santos Boffo; Ivo Gomes de Mattos; Marta Osório Ribeiro; Suzana Jardim & Valéria Carla de Souza</i>	
Tuberculosis' laboratorial diagnosis in Rio Grande city, RS, Brazil	
Incidência de parasitos intestinais em material sub-ungueal e fecal em crianças da Creche Aprisco - Fortaleza, CE	39
<i>Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra; Maria de Fátima Oliveira; Ana Leonor de Lima Miranda; Marta Cristhiany Cunha Pinheiro & Rosângela Maria Araújo Teles</i>	
Incidence of intestinal parasites in sub-nail and fecal materials in children of Daycare Center Aprisco - Fortaleza, CE	
<i>Artigo de revisão</i>	
Estudo sobre as possíveis vias de transmissão do Herpesvírus Humano tipo 8	41
<i>Vivian de Lima Spode & Virginia Minghelli Schmitt</i>	
Study about possibles routes in the transmission of Human Herpesvirus 8	
Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária no diagnóstico de doença hemolítica por defeito de membrana	45
<i>Paulo Roberto Favero; Maria Suely Soares Leonart & Aguinaldo José do Nascimento</i>	
Electrophoresis of erythrocyte membrane and hemolytic diseases caused by membrane abnormalities	

1

VOLUME 35

2003

Determinação de nitritos em alimentos cárneos*

Nitrite's determination in food contents meat

Francisco Afrânio Cunha¹; Teresa M. de Jesus P. Carvalho²; Everardo Albuquerque Menezes²; Micheline Soares C. Oliveira¹; Petrônio Augusto S. Souza¹; Alexandra Fernandes Pereira³ & Aurelice Barbosa de Oliveira³

RESUMO – Os nitratos e os nitritos são encontrados naturalmente no meio ambiente, além de serem utilizados como aditivos alimentares, logo podem ser ingeridos através da alimentação e da água. Determinar a quantidade de nitritos presentes em alimentos é justificado devido a sua potencial toxicidade química, podem ser formados a partir dos nitratos, além de serem precursores das nitrosaminas, substâncias cancerígenas. Foram analisadas 44 amostras de produtos cárneos, e feitas as determinações dos teores de nitritos. A técnica utilizada em nosso estudo foi o método Griess-Yslovay modificado. Todos os produtos analisados apresentaram concentração abaixo do limite estabelecido, 150 ppm e as salsichas tiveram o teor mais elevado para nitritos.

PALAVRAS-CHAVE – Nitritos, nitrosaminas, método de Griess-Yslovay.

SUMMARY – The nitrates and nitrites are found in the environment way, are used also as additive of the food then they can be swallowed through of the feeding and of the water. To determine the amount of nitrites in foods is justified due to its chemical toxicity potential. The nitrites are formed from nitrates, being precursory of the nitrosamines, substances that provoke cancer. 44 samples of food contents meat were analyzed and made determination of grade the of nitrites. The technique used in our study was the Griess-Yslovay method modified. All yhe analyzed products presented concentration under of established limit 150 ppm, and the sausages had the high grade of the nitrites.

KEYWORDS – Nitrites, nitrosamines, Griess-Yslovay method.

INTRODUÇÃO

No Brasil e em inúmeros países, os aditivos alimentares são usados amplamente, exercendo diferentes funções no produto final. Seu emprego é, entretanto, limitado por legislações específicas, apoiadas em critérios restritivos que levam em consideração recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS)^{1,5}.

Os nitritos nos alimentos foram alvo de preocupação, quando foram implicados em casos de leucemia na infância³. Entre os aditivos utilizados como conservantes, estão os nitritos e os nitratos os quais são adicionados aos alimentos cárneos, para conferir-lhes a cor rosada e sabor característico e evitar o crescimento de microrganismos, principalmente o *Clostridium botulinum*^{6,14}. A cor rósea dos alimentos curados é obtida devido à formação do pigmento nitrosilmioglobina, resultado da reação da mioglobina com óxido nítrico proveniente da redução do nitrito⁵.

Os nitratos podem ser encontrados no meio ambiente, isto é, no solo, alimentos, água e ar. Os nitratos podem se reduzir e produzir os nitritos no meio biológico⁸. Os nitritos por sua vez em pH ácido e na presença de aminas e amidas secundárias podem formar as nitrosaminas e nitrosamidas, compostos reconhecidamente cancerígenos⁷. Com o objetivo de padronizar uma técnica de determinação de nitritos de fácil realização e determinar a concentração de nitritos em alimentos à base de carne, foram analisadas 44 amostras de produtos cárneos comercializados na cidade de Fortaleza, no período de julho a agosto de 2002. Os produtos selecionados foram:

salsicha, lingüiça, mortadela, salame, carne enlatada, fiambre, feijoada, carne de hambúrguer e presunto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de 8 marcas de salsicha, 6 de lingüiça, 14 de mortadela, 5 de presunto, 1 de feijoada, 2 de salame, 2 de patê, 3 de carne enlatada, 2 de carne de hambúrguer e 1 amostra de fiambre. Das amostras foram pesadas 10,0 g e em seguida utilizou-se o método de Griess-Yslovay^{1,9} modificado, onde o nitrito é extraído em solução ácida a quente, sofrendo uma reação de diazotação com o ácido sulfanílico e posterior acoplamento do sal de diazônio com o α -naftol, formando um composto colorido que foi lido em espectrofotômetro a 474 nm.

DISCUSSÃO

A determinação espectrofotométrica de nitritos é uma técnica simples, de baixo custo, com resultados reprodutíveis e que pode ser usada na rotina laboratorial¹¹. A quantificação do teor de nitritos presentes em alimentos é justificada devido a sua potencial toxicidade¹³. Dentre as amostras analisadas, as que apresentaram maiores teores de nitritos foram as amostras de salsichas, lingüiças, presunto e mortadela. O limite de ingestão diária de nitrito recomendado pela OMS é de 0,06 mg/ kg de peso corpóreo¹⁵. Um adulto de 70 kg poderá consumir apenas 4,2 ppm de nitrito por dia sem que ocorram riscos à saúde, o que corresponderia aproximadamente a 60 g da

Recebido em 3/10/2002

Aprovado em 14/10/2002

*Trabalho realizado na Universidade Estadual do Ceará e na Universidade Federal do Ceará.

¹Professor do Curso de Química da Universidade Estadual do Ceará;

²Professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará;

³Alunos do Curso de Química da Universidade Estadual do Ceará

RESULTADOS

Nas Figuras 1 a 6 são mostrados os teores de nitritos, em ppm (partes por milhão), encontrados nos produtos cárneos estudados:

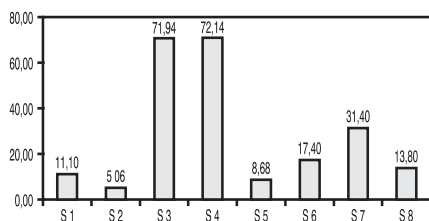


FIG. 1 - Teor de nitrito, em ppm, nas amostras de salsichas.

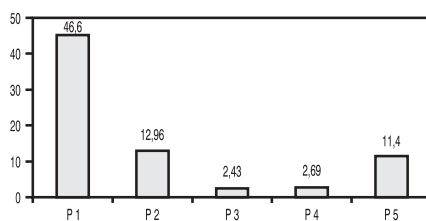


FIG. 2 - Teor de nitrito, em ppm, nas amostras de presunto.

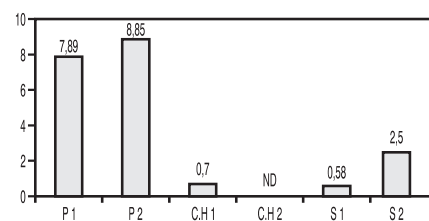


FIG. 3 - Teor de nitrito, em ppm, nas amostras de patê (P), carne de hambúrguer (CH) e salame (S). ND- não detectado.

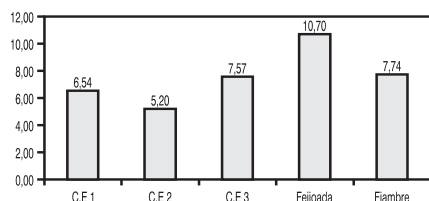


FIG. 4 - Teor de nitrito, em ppm, em amostras de carne enlatada (C.E), feijoada e fiambre.

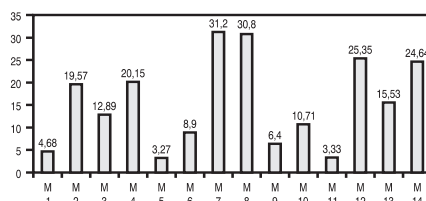


FIG. 5 - Teor de nitrito, em ppm, em amostras de mortadela.

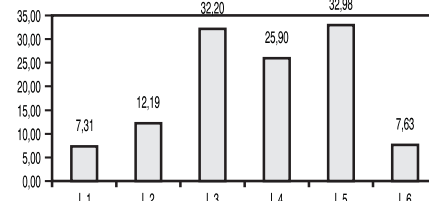


FIG. 6 - Teor de nitrito, em ppm, em amostras de lingüiça.

salsicha 4 (Fig. 1). A legislação brasileira determina que o limite máximo permitido para nitrito em produtos cárneos é de 150 ppm de nitrito¹², portanto, todos os produtos analisados estavam dentro dos valores permitidos pela legislação. Os nitritos são potencialmente tóxicos, principalmente, para crianças. Crianças que comem mais de 12 cachorros-quentes por mês, tinham 9 vezes mais chances em desenvolver leucemia na infância, do que crianças que não possuíam esses hábitos alimentares³. Num estudo realizado na Espanha, avaliando a presença de nitritos em alimentos para crianças, foi observado que nenhuma das amostras continha mais que 0,05 ppm de nitrito. Sabe-se que a ingestão de alimentos com elevados teores de nitritos pode provocar a metemoglobinemia, principalmente em crianças⁷. Em nosso estudo, produtos que têm a preferência das crianças, como por exemplo: salsichas, lingüiça e mortadela apresentam um teor considerável de nitrito. As mortadelas recebem em seu processo de preparação até 120 ppm de nitritos. Esse valor decai para cerca de 15 a 32 ppm ao final do processo². Em nosso estudo, encontramos mortadela com até 31,2 ppm de nitrito (Fig. 6). Outros alimentos podem apresentar nitritos como, por exemplo, o queijo que num estudo realizado na Grécia, foram detectados até 2 ppm de nitrito nos queijos comercializados na região⁸. É na possibilidade de formação de composto *N*-nitroso *in vivo* que reside o maior risco toxicológico relacionado aos nitritos. Entre os locais do organismo que podem ocorrer a nitrosação das aminas, amidas e aminoácidos, destacam-se, o estômago, onde existem condições altamente favoráveis de acidez; a cavidade bucal e a bexiga urinária podem também ser sítio de nitrosação de aminas, formando os compostos nitrosaminas, substâncias reconhecidas cancerígenas¹⁰. Vários estudos têm fornecido informações e encontrado correlações entre o teor de nitrito na alimentação e aumento do risco do câncer de bexiga, esôfago, nasofaringe, próstata e linfomas não-Hodgkin². Diante do potencial tóxico do nitrito, o uso dele em alimentos tem sido questionado, sua eliminação é desejável, entretanto não será fácil encontrar um substituto com as mesmas qualidades e sem o efeitos indesejáveis².

CONCLUSÕES

- A determinação espectrofotométrica de nitritos é uma técnica fácil de montar e fácil de se trabalhar na rotina laboratorial.
- Os produtos cárneos são alimentos que apresentam teores importantes de nitritos.
- As salsichas, mortadelas e lingüiças estão entre os alimentos cárneos estudados os que apresentaram maior teor de nitritos.

REFERÊNCIAS

1. Allinger, N. L.; Cava, M. P.; Jonch, D. C.; Johnson C. R.; Lebel, N. A.; Steven, C. L. *Química Orgânica*. 3ª edição, Rio de Janeiro; Guanabara Dois. 961p. 1978.
2. Al-Shuib, A. M.; Al-Abdullah, B. M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. *Meat Science*. v 62, p. 473-8, 2002.
3. Cassens R. G. Use of sodium nitrite in cured meat today. *Food Technology*. v 7, p.72-115. 1995.
4. Chung, M. J.; Lee, S. H.; Ung, N. J. Inhibitory effect of wole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of *N*-nitrosodimethylamine in humans. *Cancer Letters*. v.182, p.1-10. 2002.
5. Faria, J.A.F.; Felício, P.E.; Neves, M.A.; Romano, M.A. Formação e estabilidade de produtos cárneos curados. *Rev. Tec. Carnes*. v 3(1), p.1-9. 2001.
6. Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scanlan, R. A. Volatile nitrosamines in fried bacon. *J. Agric. Food Chem*. v.45, p.1816-8. 1997.
7. Hardisson, A.; González Padrón, A.; Frías, I.; Reguera, J. L. The evaluation of the content nitrate and nitrite in food products for infants. *J. Food Composition and Analysis*. v.9, p.13-7. 1996
8. Kyriakidis, N. B.; Tarantili-Georgiou, K.; Tsani-Batzaka, E. Nitrate and nitrite content of greek cheeses. *J. Food Composition and Analysis*. v.10, p.343-9. 1997.
9. Lara, W. H.; Takahashi, M. Y.; Silveira, N. Determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*. v.38(2), p.161-7. 1974.
10. Midio, A. F.; Martins, D. I. *Toxicologia de Alimentos*. São Paulo: Varela, p.49-147. 2000
11. Miranda, K. M., Espey, M. G.; Wink, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. v.5(1), p.62-71. 2001.
12. Pardi, M. C.; Santos, I. F.; Souza, E. R.; Pardi, H. S. *Ciência e Tecnologia da Carne*. 1ª edição, Goiás, Editora UFG. v.1, p.590. 1996.
13. Pringuez, E.; Suade, L.; Hulent, C. Improvement of standard method of 95A: 1984 for determination of the nitrate and nitrite contents of dried milk. *J. Food Composition and Analysis*. v 8, p.344-50. 1995.
14. Roberts, T. A. The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric*. v 26, p. 1755-60. 1975.
15. Zanini, P.; Oga, L. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, Atheneu. 1996.

Endereço para correspondência
Francisco Afrânio Cunha
Rua Cap. Francisco Pedro, 1210 - Rodolfo Teófilo - 60430-370 - Fortaleza - CE
E-mail: afraniocunha@bol.com.br

Estudo comparativo dos resultados obtidos pelos métodos de imunocromatografia e o ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-vírus dengue*

Comparative study of the results obtained by immunocromatography methods and ELISA IgM and IgG antibodies detection antidengue virus

Fábio Carmona de Jesus Maués¹; Sueli Guerreiro Rodrigues² & Márcio Roberto Teixeira Nunes³

RESUMO – O dengue constitui sério problema de saúde pública no mundo, especialmente na maioria dos países tropicais. No Brasil, o diagnóstico sorológico é realizado pelo ensaio imunoenzimático para captura de IgM (MAC-ELISA) e IgG (ELISA IgG) anti-dengue, entretanto, inúmeros kits estão disponíveis no mercado. Nesse estudo, o Kit Dengue - Teste Rápido em Tira (KD-TRT) é comparado com as técnicas padrões. Foram utilizadas 72 soros, incluindo soros de pacientes com infecção confirmada ou presuntiva por dengue, com infecção por febre amarela e rubéola, bem como, de pacientes com sorologia dengue negativa. O KD-TRT apresentou sensibilidade de 54,2% e especificidade de 100% mediante análise dos soros de pacientes com ou sem dengue. Quando incluídas as amostras de febre amarela e rubéola, o KD-TRT apresentou os índices de 54,2% e 91,2% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Os resultados da detecção de anticorpos IgG do KD-TRT foram correlacionados com os resultados do ELISA IgG. O ELISA IgG detectou 20 (38,5%) reações primárias, 17 (32,7%) reações secundárias e 15 (28,8%) reações negativas, enquanto que o KD-TRT detectou 11 (21,2%), 7 (13,5%) e 34 (65,3%), respectivamente. O KD-TRT apresentou menor sensibilidade e especificidade em relação ao MAC-ELISA e baixa correlação de resultados com ELISA IgG.

PALAVRAS-CHAVE – Dengue, anticorpos IgM e IgG, MAC-ELISA, ELISA IgG, Kit Dengue – Teste Rápido em Tira.

SUMMARY – Dengue virus constitutes an important public health problem worldwide, specially in areas of tropical countries. In Brazil, the serologic diagnostic is carried out by immune enzyme assays for IgM (MAC-ELISA) and IgG (ELISA IgG) anti-dengue antibodies detection, however several kits are available for this purpose. In this study, the Kit Dengue-Rapid Test Strip (KD-RTS) is compared with gold standard techniques. A total of 72 sera were used including patients with DEN presumptive or recent infection, yellow fever or rubella infection, and with negative serology for dengue. The KD-RST showed 54.2% of sensitivity and 100% of specificity by the analysis of the samples from patients with or without DEN. When yellow fever and rubella samples were included, the KD-RTS showed 54.2% and 91.2% of sensitivity and specificity, respectively. The KD-RTS IgG results were correlated with those obtained by ELISA IgG. The ELISA IgG detected 20 (38.5%) primary, 17 (32.7%) secondary and 15 (28.8%) negative reactions, whereas the KD-RTS detected 11 (21.2%), 7 (13.5%) and 34 (65.3%), respectively. The KD-RTS revealed less sensitivity and specificity in comparison to MAC-ELISA, and low results correlation with ELISA IgG.

KEYWORDS – Dengue, antibody IgM and IgG, MAC-ELISA, ELISA IgG, Kit Dengue – Rapid Test Strip.

INTRODUÇÃO

O vírus dengue (VDEN) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e possui 4 sorotipos imunologicamente distintos: VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 e o VDEN-4 (Van Regenmortel *et al*, 2000). De acordo com suas peculiaridades ecológicas e imunológicas, está incluso no "grupo B" dos "arbovírus". Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1985):

Arbovírus são vírus mantidos em natureza mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos ou entre hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode pela via transovariana e, possivelmente, da via venérea; multiplicam-

se e produzem viremia nos vertebrados, multiplicam-se em tecidos de artrópodes e são passados a novos vertebrados susceptíveis através da picada dos artrópodes, após um período de incubação extrínseco.

O dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente na maioria dos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito vetor, o *Aedes aegypti* (MS/FUNASA, 1996). Em áreas onde provoca epidemias anualmente, como no Brasil e na Ásia, a dengue é uma doença grave em termos de morbidade, mortalidade e custos econômicos; sendo considerada também como a arbovirose mais difundida no mundo, ocorrendo em todos os continentes,

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 11/7/2002

*Prêmio NEWPROV - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

*Esta pesquisa foi realizada integralmente no setor de arbovíroses do Instituto Evandro Chagas.

¹Farmacêutico, cursando o primeiro semestre de bioquímica no CESUPA (Centro de Ensino Superior do Pará), bolsista do CIEE (Centro de Integração Empresa Escola) no Instituto Evandro Chagas; ²Farmacêutica Bioquímica, mestrado em ciências biológicas, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas;

³Biomédico, Especialista em biologia molecular dos arbovírus, pesquisador colaborador do Instituto Evandro Chagas.

exceto na Europa (Travassos da Rosa *et al.*, 1996). Cerca de dois bilhões de pessoas vivem em áreas onde é possível a transmissão de dengue, e o número de casos é estimado entre 50 e 100 milhões por ano (Martins & Castineiras, 2001).

Por não apresentar sintomas específicos, a dengue pode ser confundida clinicamente com várias outras doenças, como a leptospirose, o sarampo e a rubéola, pois as mesmas são doenças que provocam febre, prostração, dor de cabeça e dores musculares generalizadas (Travassos da Rosa *et al.*, 1996). A infecção pelo VDEN pode ser assintomática ou pode levar a uma síndrome febril viral indiferenciada, denominada síndrome da febre do dengue ou febre clássica do dengue (FD), e a febre hemorrágica do dengue (FHD), com ou sem síndrome de choque do dengue (SCD) (Paho, 1994).

O diagnóstico laboratorial específico pode ser realizado através de isolamento do vírus, testes sorológicos, detecção do genoma e/ou antígenos virais (Travassos da Rosa *et al.*, 1996).

O diagnóstico sorológico pela detecção de anticorpos específicos; pode ser realizado mediante as técnicas tradicionais empregadas em virologia, como o teste de inibição da hemaglutinação (IH), teste de fixação do complemento (FC) e teste de neutralização; ou pelo uso de técnicas desenvolvidas posteriormente a estas, entre as quais, se destaca o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Paho, 1994).

As metodologias tradicionais, citadas acima, são eficientes e sensíveis, porém o tempo entre a coleta do material e a conclusão do diagnóstico é relativamente longo, por fatores decorrentes da própria técnica ou da evolução da resposta imune do paciente. O ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) (Kuno *et al.*, 1987) abreviou esse tempo, já que permite concluir o diagnóstico com uma amostra de soro da fase aguda da doença, porém, ainda assim, muitas vezes a confirmação laboratorial coincide com a melhora do paciente, pois o MAC-ELISA pode ser positivo na primeira semana após o início dos sintomas mas, em geral, só alcança positividade igual ou superior a 80%-90% a partir do 5^o-7^o dias de doença (Paho, 1994).

O MAC-ELISA é o teste "padrão ouro" utilizado pela Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (RNLSP) para diagnóstico laboratorial presuntivo de infecções recentes pelo vírus dengue. A sensibilidade e a especificidade do MAC-ELISA foi verificada em relação ao IH pelo teste de amostras de soros pareadas de 386 pacientes, e a comparação de resultados dos soros colhidos na fase aguda revelou 10% de falso-negativos e 1,7% de falso-positivos (Paho, 1994).

No Brasil, o número de casos de dengue aumenta nos meses de maior índice pluviométrico, sobrecarregando os laboratórios da rede pública e particular. Atualmente existem muitos kits (termo em inglês, consagrado pelo uso em análises clínicas, que designa embalagem contendo reagentes destinados à realização de um determinado exame) comerciais para o diagnóstico de dengue, apresentando como principais vantagens sobre as técnicas mencionadas, a brevidade na obtenção do resultado pela rápida execução do teste. Entretanto, ainda não foram oficialmente adotados pela rede pública por ainda não terem sido avaliados quanto a sua eficiência.

A elaboração de um painel de soros para avaliação de kits para diagnóstico de dengue é uma tarefa que tem gerado polêmica. As recomendações constantes no Report of Meeting of Dengue Laboratories in the Americas (Paho - OMS, 1996), orienta que o painel deve ser composto de 600 amostras, incluindo:

(i) pequeno número de soros positivos altos e soros negativos de áreas não endêmicas,

(ii) Maior quantidade de soros com resultados duvidosos, ou seja, positivos médios a baixos e negativos de áreas endêmicas e,

(iii) amostras de soros positivos para outros flavivírus.

Neste contexto, é relevante um estudo comparativo entre o MAC-ELISA e um kit comercial para diagnóstico de dengue. O "Kit Dengue - Teste Rápido em Tira" (KD-TRT) faz a detecção de anticorpos da classe IgM e IgG, simultaneamente, através do método de imunocromatografia e foi selecionado para o estudo devido sua utilização por diversos laboratórios particulares que realizam o diagnóstico de dengue. A detecção de anticorpos IgG pelo KD-TRT permite a distinção entre infecção primária e infecção secundária.

A infecção primária induz produção de anticorpos contra o vírus infectante, porém anticorpos grupo-específicos podem ser observados em títulos mais baixos para os demais vírus do mesmo grupo. A resposta sorológica na infecção secundária é excessivamente rápida e há completa ausência de especificidade; altos títulos de anticorpos são produzidos para os membros do grupo (Gubler & Kuno, 1999). Esse fato deve ser levado em consideração em áreas onde circulam diversos arbovírus do mesmo grupo, para evitar diagnóstico incorreto por conta de reações cruzadas, caso a amostra suspeita não seja testada simultaneamente contra os diversos arbovírus relacionados (Gubler & Kuno, 1999).

De acordo com a bula do KD-TRT, sua performance foi analisada quanto à sensibilidade, utilizando soros pareados com infecção primária de dengue (n=17) e soros pareados com infecção secundária de dengue (n=16); e especificidade, utilizando amostras positivas para Malária (n=5), Leptospirose (n=20) e Encefalite Japonesa (n=9) e, também, soros pareados de pacientes com sintomas de dengue e sem evidência laboratorial de infecção por dengue (n=17). Os resultados foram de 76% e 88% de sensibilidade para infecções primárias e secundárias, respectivamente; e 87% de especificidade no teste com outros agentes.

No presente estudo, um conjunto de soros criteriosamente selecionados foi utilizado para análise comparativa dos resultados obtidos pelo KD-TRT e o teste padrão para detecção de anticorpos IgM (MAC-ELISA) utilizado pela RNLSP do Brasil, bem como, pelo teste para detecção de anticorpos IgG (ELISA IgG) do CDC. Supomos que o desempenho do KD-TRT, como método alternativo no diagnóstico sorológico de dengue poderá ser especulado mediante a análise de alguns parâmetros como:

(i) índices de sensibilidade e especificidade do KD-TRT em relação ao MAC-ELISA;

(ii) taxas de resultados falso-negativo e falso-positivo pelo KD-TRT em relação ao MAC-ELISA e

(iii) correlação dos resultados da detecção de anticorpos IgG pelo KD-TRT com aqueles obtidos pela técnica de ELISA IgG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção das amostras utilizadas

No estudo de correlação entre os resultados de detecção de anticorpos IgM pelo KD-TRT e pelo MAC-ELISA, bem como, entre os resultados de anticorpos IgG pelo KD-TRT e pelo ELISA IgG, foram utilizadas 72 amostras de soros da demanda da rotina do Instituto Evandro Chagas, os quais estão preservados em sua soroteca (Tabela I). Além dos soros de pacientes comprovadamente com dengue e com diagnóstico presuntivo de dengue, tam-

bém foram incluídos soros de pacientes soropositivos para febre amarela (flavivírus), com sorologia positiva para rubéola e também negativos para dengue.

Pacientes comprovadamente com dengue

Foram selecionados soros pareados de 15 pacientes que apresentavam a primeira amostra colhida durante a fase aguda da doença com isolamento do VDEN e a segunda, durante a fase de convalescença. Do total de 15 isolamentos, 8 foram DEN-1 e 7 foram DEN-2. Todos os pacientes são provenientes do município de Belém do Pará e foram atendidos na seção de arbovírus do IEC no período de fevereiro de 1998 até maio de 2001.

Pacientes com diagnóstico presuntivo de dengue

Foram selecionados 12 soros de pacientes provenientes do Estado do Pará com diagnóstico presuntivo de dengue, isto é, com um diagnóstico baseado nos aspectos clínicos e na detecção de anticorpos IgM antidengue no soro, coletado durante a fase aguda da doença. Das 12 amostras, 7 são de pacientes de Belém, 2 de Salvaterra, 2 de Magalhães Barata e 1 de Brejo Grande do Araguaia (todos localizados no estado do Pará), no período de fevereiro de 2000 até setembro de 2001.

Pacientes com febre amarela

Foram selecionados 9 soros oriundos da epidemia de febre amarela que ocorreu no município de Afuá, Estado do Pará, durante o período de março até maio de 1998; e uma amostra proveniente do Estado do Mato Grosso.

Pacientes com rubéola

Os soros de 10 pacientes com rubéola foram gentilmente cedidos pela Dr^a Elizabete Santos, do serviço de Meio Ambiente do IEC. A ficha epidemiológica desses pacientes não continha informação quanto a infecções anteriores por VDEN ou vacinação anti-amarela.

Pacientes sem dengue

Foram selecionadas amostras de soros de pacientes que apresentavam resultados negativos para flavivírus, pelo teste de IH para amostras pareadas. Do total de 10 soros, 6 foram oriundos de Goiânia e 4 do Espírito Santo.

Técnicas sorológicas

Ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)

O ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é o procedimento sorológico

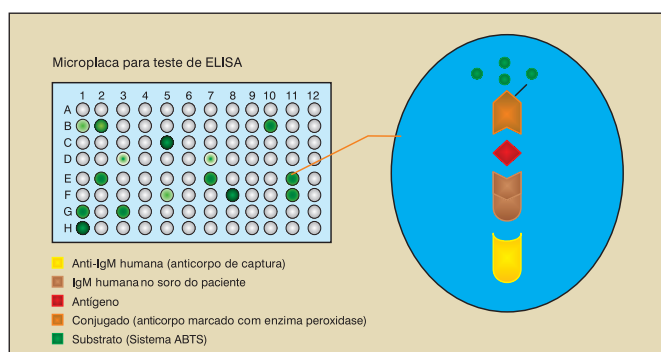


FIG. 1 - Representação esquemática da formação de imunocomplexo em reação positiva no teste de MAC-ELISA (Fonte: IEC).

mais útil disponível para determinar infecções recentes por VDEN. Este teste geralmente substitui outras técnicas devido a sua sensibilidade, possibilidade de automação e capacidade de acomodar um grande número de amostras (KUNO *et al.*, 1987) (Figura 1).

Ensaio Imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgG (ELISA IgG)

Duas variações do ELISA IgG têm sido descritas. Burke *et al.* (1982) usaram um ensaio de captura para mensurar anticorpos IgG semelhante ao sistema utilizado para a detecção de anticorpos da classe IgM. A diferença neste sistema está na utilização de anticorpos de captura anti-IgG. Outro sistema, ainda mais sensível, foi descrito por Kuno e colaboradores em 1991, e tem sido muito utilizado por laboratórios de referência como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças 2 Calle Casia- San Juan, Porto Rico: o antígeno é adsorvido diretamente na placa, sempre usando um anticorpo de captura (Figura 2).

KD-TRT

O KD-TRT é um teste para detecção qualitativa presuntiva de anticorpos IgG e IgM anti-VDEN pelo método de imunocromatografia, permitindo a diferenciação entre infecção primária e secundária. O teste somente deve ser utilizado em pacientes com sintomas e sinais consistentes com infecção pelo VDEN. Os resultados são presuntivos e devem ser complementadas através do isolamento do vírus, análises de soro pareados, detecção imunohistoquímica do antígeno ou detecção do ácido nucléico do vírus, para confirmação da infecção pelo VDEN (vide bula do *kit*).

TABELA I
Número de amostras utilizadas de acordo com o critério determinado

Amostras	Evidência	Quantidade
Soros comprovadamente positivos para DEN-1	Soro (1) com isolamento do VDEN-1	08
	Soro (2) com IgM antidengue	08
Soros comprovadamente positivos para DEN-2	Soro (1) com isolamento do VDEN-2	07
	Soro (2) com IgM antidengue	07
Soros com diagnóstico positivo para Dengue	Deteção de anticorpos IgM antidengue	12
Soros de pacientes com febre amarela	Casos notificados em 1998	10
Soros de pacientes com rubéola	Sorologia positiva	10
Soros de pacientes sem Dengue	Soros (1) e (2) negativos por sorologia	10
Total		72

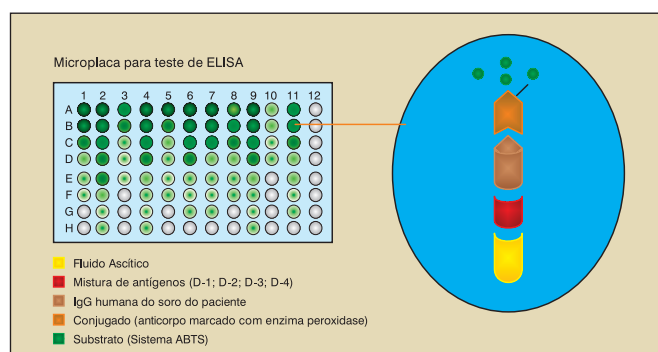


FIG. 2 - Representação esquemática da formação de imunocomplexo em reação positiva no teste do ELISA IgG (Fonte: IEC).

Índices de sensibilidade e especificidade

Os índices de sensibilidade e especificidade são calculados empregando-se um quadro de dupla entrada onde se representa de um lado a existência ou não da doença e de outro a positividade ou negatividade do teste (Tabela II) (Ferreira & Ávila, 2001).

Com base na Tabela II, podemos calcular a sensibilidade e a especificidade, bem como as reações falsas, utilizando fórmulas (Quadro 1).

RESULTADOS

Os resultados do MAC-ELISA para os 52 soros de pacientes com ou sem dengue, sem incluir os 20 soros de pacientes com febre amarela e rubéola, foram classificados conforme a densidade óptica (DO) em positivo baixo ($DO < 0.500$), positivo médio ($0.500 \leq DO < 1.000$) e positivo alto ($DO \geq 1.000$). Os resultados do KD-TRT foram correlacionados conforme a escala de absorbância estabelecida para o MAC-ELISA (Tabela III). Das 52 amostras testadas, 24 (46,15%) foram positivas para dengue pelo MAC-ELISA, enquanto 13 (25%) foram positivas pelo KD-TRT.

O KD-TRT quando comparado com o MAC-ELISA (Tabela IV) apresentou sensibilidade de 54,2%, especificidade de 100%, falso-positividade de 0% e falso negatividade de 45,8% (Quadro 2).

Os índices de sensibilidade e especificidade foram também calculados para um total de 72 soros (Tabela V), referentes às amostras da tabela de correlação e de pacientes com infecção pelo vírus da febre amarela e com diagnóstico sorológico de rubéola (Quadro 3).

O KD-TRT permite avaliar, de forma presuntiva, se a resposta imunológica humoral do paciente foi do tipo primária ou secundária, desta forma foi realizada uma comparação entre o KD-TRT e os resultados de detecção de anticorpos IgG pelo método de ELISA. Do total de 52 amostras o IgG ELISA detectou 20 (38,5%) reações primárias, 17 (32,7%) reações secundárias e 15 (28,8%) reações negativas, enquanto que o KD-TRT detectou 11 (21,2%), 7 (13,5%) e 34 (65,3%) reações primárias, secundárias e negativas, respectivamente (Tabela VI).

DISCUSSÃO

Inicialmente, os índices de sensibilidade e especificidade para o KD-TRT foram calculados empregando-se o quadro de dupla entrada (Tabela II), considerando os resultados obtidos no MAC-ELISA para 52 amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de dengue, bem como soros de pacientes sem dengue. Do total de 52 amostras, 11 (21,1%) apresentaram resultados discordantes (Tabela III). Das 24 amostras positivas para dengue pelo MAC-ELISA, 11 (45,8%) foram negativas pelo kit, comprometendo seu índice de sensibilidade que foi de 54,2%. O Dos 11 "falso-negativos" pelo KD-TRT, 5 (45,4%) corresponderam a positivos baixos por MAC-ELISA. (Tabela IV). Os soros negativos apresentaram perfeita correlação, visto que não ocorreram reações "falso-positivas" pelo KD-TRT.

O índice de especificidade e de falso-positividade do KD-TRT muda quando incluímos nos cálculos as amostras de pacientes com febre amarela e rubéola. A detecção de 3 resultados "falso-positivos", sendo um com soro positivo para febre amarela e 2 para rubéola, baixou a especificidade de 100% na correlação com o MAC-ELISA para 93,75% e determinou um índice de falso-positividade de 6,25% (Tabela V). Entretanto essas reações também foram detectadas por MAC-ELISA, uma decorrente de reação

TABELA II

Quadro utilizado para o cálculo dos casos de verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falso-positivos e falso-negativos na avaliação de um teste diagnóstico (Fonte: Ferreira & Ávila)

Teste	Doente	Não-doente	
Positivo	Verdadeiros positivos (VP)	Falso-positivos (FP)	Total de positivos
Negativo	Falso-negativos (FN)	Verdadeiros negativos (VN)	Total de negativos
	Total de doentes	Total de não doentes	Total geral

Sensibilidade (S) = $\frac{VP}{VP+FN} \times 100$	Especificidade (E) = $\frac{VN}{VN+FP} \times 100$
Falso-negativos (FN) = $\frac{FN}{VP+FN} \times 100$	Falso-positivos (FP) = $\frac{FP}{VN+FP} \times 100$

Quadro 1 - Fórmulas para cálculo dos índices de Sensibilidade, Especificidade, Falso-Negativos e Falso-Positivos.

TABELA III

Correlação de resultados das amostras testadas por MAC-ELISA e o KD-TRT em relação a detecção de anticorpos IgM (PB=positivo baixo, PM=positivo médio, PA=positivo alto, NEG=negativo)

Amostras	MAC-ELISA/ DENGUE	KD-TRT		
		Positivo	Negativo	
Dengue (isolamento do vírus no soro 1)	PA	8	7	1
	PM	3	1	2
	PB	5	2	3
	NEG	14	0	14
Dengue (suspeita clínica)	PA	1	0	1
	PM	5	3	2
	PB	2	0	2
	NEG	4	0	4
Sem dengue	NEG	10	0	10
Total		52	13	39

$S = \frac{13}{24} \times 100 = 54,2\%$	\Rightarrow	Sensibilidade = 54,2%
$E = \frac{45}{48} \times 100 = 93,75\%$	\Rightarrow	Especificidade = 93,75%
$FN = \frac{11}{24} \times 100 = 45,8\%$	\Rightarrow	Falso-negatividade = 45,8%
$FP = \frac{3}{48} \times 100 = 6,25\%$	\Rightarrow	Falso-positividade = 6,25%

Quadro 2 - Fórmulas e cálculos dos índices de sensibilidade, especificidade, falso-negatividade e falso-positividade em relação às 52 amostras com dengue, sem incluir os positivos para FA e RUB.

TABELA IV

Comparação dos resultados do KD-TRT em relação ao MAC-ELISA para as 52 amostras, sem incluir as positivas para FA e RUB

KD-TRT	MAC-ELISA/ positivo dengue	MAC-ELISA/ negativo dengue	Total
Positivos	13	0	13
Negativos	11	28	39
Total	24	28	52

$S = \frac{13}{24} \times 100 = 54,2\%$	\Rightarrow	Sensibilidade = 54,2%
$E = \frac{45}{48} \times 100 = 93,75\%$	\Rightarrow	Especificidade = 93,75%
$FN = \frac{11}{24} \times 100 = 45,8\%$	\Rightarrow	Falso-negatividade = 45,8%
$FP = \frac{3}{48} \times 100 = 0\%$	\Rightarrow	Falso-positividade = 6,25%

Quadro 3 - Fórmulas e cálculos dos índices de sensibilidade, especificidade, falso-negatividade e falso-positividade em relação a todas as 72 amostras.

TABELA V
Comparação dos resultados do KD-TRT em relação ao MAC-ELISA para todas as 72 amostras

KD-TRT	Dengue	Não Dengue	Total
Positivos	13	3	16
Negativos	11	45	56
Total	24	48	

TABELA VI

Métodos	IgG ELISA		KD-TRT			
	Resultado	RP	RS	RS*	NEG	
Dengue (isolamento do vírus no soro 1)	RP	14	3	0	0	11
	RS	12	5	2	4	1
	NEG	4	0	0	0	4
Dengue (suspeita clínica)	RP	4	2	0	0	2
	RS	5	1	0	1	3
	NEG	3	0	0	0	3
Sem dengue	RP	2	0	0	0	2
	NEG	8	0	0	0	8
Total		52	11	2	5	34

cruzada (baixa absorvância) com soro positivo para febre amarela e as 2 com soros positivos para rubéola. É importante ressaltar que as reações positivas para dengue com os soros de pacientes com diagnóstico de rubéola não significam, necessariamente, uma "reação inespecífica" já que em infecções primárias os anticorpos IgM para dengue em geral persistem por cerca de 60 a 90 dias (PAHO, 1994) e o paciente, que mora em área endêmica de dengue, já poderia possuí-los no momento da infecção pelo vírus da rubéola. Assim, se considerarmos as reações para rubéola como verdadeiras (visto que também foram observadas no MAC-ELISA), a especificidade seria de 97,82% e falso-positividade de 2,18%.

A correlação dos resultados entre o KD-TRT e o ELISA IgG, no que tange o padrão de resposta sorológica, demonstrou baixa concordância de resultados, visto que das 20 amostras com resposta primária e 17 com resposta secundária detectadas pelo ELISA IgG, apenas 5 (25%) e 7 (41,2%) foram detectadas pelo KD-TRT, respectivamente. Ressalta-se que as amostras negativas pelo ELISA IgG apresentaram perfeita correlação de resultados com o KD-TRT.

Torna-se necessário aumentar o número de amostras no sentido de realizar uma avaliação quanto ao desempenho do KD-TRT, visto que o número limitado de amostras usadas no presente estudo permitiu apenas uma análise de correlação com o MAC-ELISA.

Vale ressaltar também que a bula do KD-TRT, produzida pelo fabricante, indica condições e limitações de uso. Citamos aqui os seguintes exemplos: a análise de uma amostra de soro simples não deve ser usada como o único critério de diagnóstico. O diagnóstico final deve ser baseado nos resultados do teste em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais. As características de desempenho do KD-TRT não foram estabelecidas para outras matrizes diferentes de soro. Soros ictericos, lipêmicos, hemolizados, e soros inativados pelo calor podem causar resultados errados e devem ser evitados

CONCLUSÃO

I) O KD-TRT possui baixa sensibilidade e alto índice de falso negatividade quando comparado ao MAC-ELISA.

II) O KD-TRT possui alta especificidade e baixo índice de falso-positividade (6,25%) quando comparado ao MAC-ELISA, mesmo quando foram incluídos soros positivos para um outro flavivírus, no caso febre amarela.

III) Observou-se baixa correlação de resultados entre o IgG ELISA e o KD-TRT no que tange o padrão de resposta sorológica primária e secundária, sendo que 25 amostras positivas pelo IgG ELISA foram negativas pelo KD-TRT.

IV) De acordo com os resultados encontrados, o KD-TRT não deveria ser utilizado como um método alternativo para substituição do teste padrão MAC-ELISA no diagnóstico de infecção recente presuntiva pelo VDEN, como vem sendo utilizados por alguns laboratórios particulares.

V) O KD-TRT permite o diagnóstico rápido de dengue, principalmente em casos de paciente que apresentem elevados títulos de anticorpos IgM e IgG anti-dengue.

REFERÊNCIAS

- Burke, D. S.; Nisalak, A.; Ussery, M. A. Antibody capture immunuassay detection of japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. p.1034-1042, 1982.
- Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 2ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.
- Gubler, D. J.; Kuno, G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Edition Cab International. New York. 1999.
- Kuno, G.; Comez, I.; Gubler, D. J. Detecting artificial antidengue IgM immune complexes using an enzymelinvolved immunosbent assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Lawrence, v.36, n.1, p.153-159, Jan. 1987.
- Kuno, G.; Comez, I.; Gubler, D. J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods*. 33(1-2) p:101-113, 1991.
- Kuno, G.; Gubler, D. J.; Sather, G. E.; Velez, M.; Oliver, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance of dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. p.158-165, 1984.
- Martins, F. S. V.; Castineiras, T. M. P. P. *Dengue*. Disponível em: www.cives.ufrrj.br/informacao/dengue/den-iv.html. Acesso em: 16/11/2001.
- MS/FUNASA. *Vigilância epidemiológica*. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0504A.htm>. Acesso em 16/11/2001.
- MS/FUNASA. *Manual de dengue - Vigilância epidemiológica e atenção ao dengue*. 2ª ed. - Brasília: DEOPE. p.79, 1996.
- OMS. *Viral hemorrhagic fever*. Technical Report; Geneva; 1985. P. 126.
- PAHO. *Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Washington: Pan Americans Health Organization, p.98. (Scientific Publication, 548), 1994.
- PAHO - OMS - *Report of meeting of dengue laboratories in the Americas - Rio de Janeiro, Brazil*. October 8, 1996.
- Travassos da Rosa, A. P. A.; Travassos da Rosa, J. F. S.; Pinheiro, F. P.; Vasconcelos, P. F. C. *Arbovíroses: dengue*. In: R. N. Q. Leão (ed.). *Doenças infecciosas e parasitárias. Enfoque amazônico*. Editora CEJUP, Belém. p.207-241, 1996.
- Van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Carstens, E. B.; Estes, M. K.; Maniloff, J.; Mayo, M. A.; McGeoch, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B. *Virus Taxonomy. The classification and nomenclature of viruses*. The seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). Virus taxonomy, VII report of the ICTV. Academic Press, San Diego. p.1167, 2000.

Endereço para correspondência

Dr. Fábio Carmona de Jesus Maués

Av. Serzedello Correa, 347/1502 - Batista Campos - 66025-240 - Belém, PA

Avaliação bioquímica e hematológica da 1ª turma feminina de cadetes da Academia da Força Aérea Brasileira

Biochemical and hematological evaluation from the 1st female cadet division of Brazilian Air Force Academy

Alexandre Elias Cosendey^{1,2}; Maria Suzana de Moraes¹; Ana Paula de Souza Diniz³ & Claudio Fernández Araujo¹

RESUMO – O acesso de mulheres às escolas militares estabeleceu um marco de mudanças na cultura militar, não só na esfera organizacional como também pela adaptação de técnicas exercidas há anos e que foram reestruturadas para um novo público. Com o intuito de avaliar estas mudanças, primeiramente entre as alunas, analisamos os efeitos dos treinamentos físicos militares, ainda na fase inicial do curso, e verificamos as alterações sangüíneas ocorridas bem como as possíveis respostas orgânicas delas decorrentes. Neste estudo, foram realizadas dosagens bioquímicas e hematológicas com base na proposta de Cosendey (1997) "Monitoração bioquímico-hematológica do condicionamento físico", pela qual verificamos diversas alterações nas concentrações das substâncias orgânicas e/ou células sangüíneas.

PALAVRAS-CHAVE – Treinamento físico para mulheres, glicose sangüínea, lesão muscular, hemograma.

SUMMARY – The women's admission to the superior military school established a mark of changes in the military culture, not only in the organizational system but also for the adaptation of technics that have been used for years and that had to change for this new public. In order to check these changes among the women, the effects of military physical training in the initial stage of the course were investigated and the blood alterations were checked as well as the possible organic responses decurrent. In this study, biochemical and hematological blood analyses were performed in agreement with Cosendey's proposal (1997), by which we can check several alterations in the organic substances and/or in blood cells.

KEYWORDS – Women's physical training, blood glucose, hemogram, muscle damage.

INTRODUÇÃO

O Curso de Formação para a 1ª turma de Oficiais femininas começou em 1996 na Academia de Força Aérea (AFA) em Pirassununga - São Paulo, de acordo com a determinação do Boletim Externo do Ministério da Aeronáutica (BMA 113-6) publicado em 30/05/95, que regulamentou o acesso de mulheres ao Curso da AFA. Atendendo aos anseios femininos, a 1ª turma iniciou as atividades no mês de janeiro, com o Curso de Formação de Oficiais (CFO) nos quadros de Aviação, Intendência e Infantaria com a presença de 18 mulheres na turma de Intendência. Esta tradicional escola que até então só recebia homens para formação, muitos vindos da Escola Preparatória de Cadetes do Ar (EPCAR) e já adaptados à doutrina militar, realizou algumas mudanças em sua estrutura para receber as novas alunas oficiais.

Este estudo foi composto de uma série de análises, no qual procuramos verificar a disponibilidade energética, no organismo das alunas, bem como o sistema de oxigenação do organismo, desta 1ª turma de oficiais femininas da AFA. Foram realizadas dosagens sangüíneas, utilizando a metodologia proposta por Cosendey - Monitoração Bioquímico-Hematológica do Condicionamento Físico[®], na qual é possível inter-re-

lacionar várias análises bioquímicas e hematológicas (em torno de 40), verificar existência de alterações metabólicas nos processos fisiológicos das alunas e observar o funcionamento de vários órgãos.

Dentro do objetivo deste trabalho, iniciamos analisando a variação da concentração do 1º combustível requisitado e utilizado pelo organismo quando submetido ao esforço que é a glicose sangüínea (Guyton, 1988), para determinar a presença de estados hipo ou hiperglicêmicos entre as alunas. A relevância deste estudo se deve ao fato de que, valores alterados de glicose, quando desconhecidos podem comprometer o desempenho físico e o rendimento intelectual, além de gerar outros desequilíbrios, pois a glicose é o único combustível que pode ser utilizado pelos neurônios, hemácias e outras células quando submetido ao esforço (Guyton, 1988 e Murray *et al.*, 1993).

Foram realizadas análises hematológicas para verificar a capacidade de oxigenação dos tecidos além da observação ao microscópio das morfologias celulares, as quais poderiam revelar alterações significativas no equilíbrio orgânico. Esse conjunto de análises proporcionou uma visualização desse processo em cada aluna, relacionado ao treinamento militar.

Com o intuito de verificar a resposta orgânica frente aos treinamentos físicos aplicados, foram dosadas

Recebido em 25/10/2002
Aprovado em 18/11/2002

¹Farmacêuticos-bioquímicos, pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Núcleo do Instituto de Ciências da Atividade Física da Aeronáutica (NUICAF);

²Diretor Científico do Laboratório Bioquímica do Esporte; ³Graduanda em Farmácia, técnica do Laboratório de Bioquímica do NUICAF.

também enzimas musculares e averiguado se o planejamento de exercícios físicos estava sendo bem assimilado pelas alunas, pois é sabido que um dos principais problemas para o planejamento de exercícios físicos, é a prescrição da intensidade de carga ideal aplicada, e que, apesar da evolução dos métodos de treinamento no controle das cargas de trabalho, ainda hoje, é encontrada uma grande incidência de sobrecarga excessiva nos trabalhos físicos (ACSM, 1995).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas todas as alunas da 1ª turma em formação na AFA (n= 18), logo no período inicial de treinamento, ou seja, na segunda semana do Estágio de Instrução Básica Militar (EIBM) do Curso de Formação de Oficiais Intendentes (CFO-Int).

Foram realizadas várias análises bioquímicas e hematológicas, das quais destacamos para este estudo, a contagem de hemácias (Hm), dosagem do seu conteúdo de hemoglobina (Hb), medida do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), a determinação do hematócrito (Hct), a contagem de leucócitos (WBC), dosagens da glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FALC), creatinquinase (CK), creatinquinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), ferro e as bilirrubinas total, direta e indireta.

As alunas foram submetidas a uma coleta sanguínea antes do início das atividades, pela manhã, em dois tubos de coleta marca BD, tipo vacutainer hemogard, sem anticoagulante para bioquímica e tubos marca BD, tipo vacutainer hemogard com EDTA-Na (sal sódico do ácido etilendiaminotetracético) para hematologia e agulhas descartáveis marca BD.

Para as dosagens bioquímicas, foi utilizado um auto-analisador Cobas Mira Plus e para as análises hematológicas, um auto-analisador Cobas Micros STEX 18, ambos da marca Roche. As contagens celulares realizadas pelo Cobas Micros STEX 18, foram confirmadas através de microscopia, num microscópio binocular Labophot 2 marca Nikon.

Cada aluna respondeu a um questionário para a obtenção de dados considerados importantes para a interpretação dos resultados, tais como: idade, peso, altura, uso de suplementos e/ou vitaminas, hábitos alimentares e anamnese patológica. Todas as alunas assinaram um termo de consentimento de pesquisa, bem como a autorização da divulgação dos resultados para fins científicos.

As recomendações para a realização da coleta sanguínea foram: jejum de 12 horas, não ingerir bebida alcoólica nas 72 horas que antecedem a coleta; evitar exercício físico intenso 24 horas antes da coleta; manter a dieta habitual nos 15 dias que antecedem os exames; relacionar todos os medicamentos que estavam sendo administrados desde a semana anterior à coleta, inclusive vitaminas e suplementos alimentares; o consumo de água deveria permanecer normal durante o jejum, assim como o uso de medicamentos que não pudessem ser descontinuados.

Os valores normais das análises bioquímicas e hematológicas realizadas neste estudo bem como as metodologias utilizadas, estão descritas nas Tabelas A e B.

TABELA A
Valores normais das análises bioquímicas propostas com suas metodologias e realizadas num Auto-analisador Cobas Mira Plus marca Roche

Substâncias analisadas	Metodologia empregada	Normalidade p/ mulheres
Glicose	Hexoquinase-UV	70-105 mg/dl
AST	Cinético UV	10-31 U/l
ALT	Cinético UV	9-36 U/l
GGT	Cinético 405 nm	7-32 U/l
FALC	Cinético 405 nm (DGKC)	< 275 U/l
CK	Cinético-UV	< 165 U/l
CK-MB	Imuno-químico cinético UV	até 25 U/l
LDH	Cinético UV	210-425 U/l
Ferro	Ferrozina /Hidroxilamina	53-167 mg/dl
Bilirrubina total	Jendrassik/Grof	0,2-1,0 mg/dl
Bilirrubina direta	Jendrassik/Grof	0,05-0,3 mg/dl
Bilirrubina indireta	Jendrassik/Grof	0,15-0,7 mg/dl

Nota: Os valores mais encontrados na população propostos no quadro das análises bioquímicas foram retirados do bulário proveniente dos "kits" de dosagens e do manual de operação do aparelho Cobas Mira Plus. Esses valores foram, também, confirmados pela literatura clássica em análises clínicas e pelos estudos realizados em mais de 100.000 análises obtidas no Laboratório de Bioquímica do NUICAF. Tabela adaptada de Cosendey (1997).

TABELA B
Valores normais das análises hematológicas realizadas em um contador eletrônico Cobas Micros STEX 18 marca Roche

Análise	Metodologia empregada pelo aparelho	Normalidade p/ mulheres
WBC	Contagem eletrônica	5,0 a 9,0 x10 ⁹ /mm ³
Hm	Contagem eletrônica	3,8 a 5,8 x10 ⁶ /mm ³
Hb	Colorimetria p/ cianometahemoglobina	12,5 a 16,5 g/dl
Hct	Soma dos VCMs da hematimetria	38 a 47 %
VCM	Medida por bioimpedância	82 a 92 μ ³
HCM	Cálculo baseado na Hb e na Hm	27 a 32 pg
CHCM	Cálculo baseado na Hb e no Hct	32 a 36 g/dl

Nota: Os valores mais encontrados na população propostos neste quadro de análises hematológicas foram adaptados pelo Laboratório de Bioquímica do Núcleo do Instituto de Ciências da Atividade Física da Aeronáutica (NUICAF) através do estudo de mais de 100.000 análises realizadas no Rio de Janeiro (1994 a 1997), em indivíduos normais, com resultados compreendidos entre os percentis 15% e 85% inclusive, conforme preconiza Oliveira, no manual de operação do aparelho Cobas Micros STEX 18 e em Tietz (1995). Tabela adaptada de Cosendey (1997).

RESULTADOS

TABELA C
Avaliação da série vermelha: dosagem de ferro e contagem de leucócitos

Dosagens	Sem alteração	Alterado	Valores médios	Valores mínimos	Valores máximos
Hm	100%	—	4,3 x 10 ⁶ /mm ³	3,89 x 10 ⁶ /mm ³	4,8 x 10 ⁶ /mm ³
Hb	16,7%	83,3%	11,3 g/dl	8,3 g/dl	13,3 g/dl
Hct	27,8%	72,2%	36,3 %	27,6%	40,5%
VCM	83,3%	16,7%	84,4 m ³	66,0 m ³	90,0 m ³
HCM	66,7%	33,3%	27,2 pg	19,9 pg	29,8 pg
CHCM	66,7%	33,3%	32,2 g/dl	30,0 g/dl	33,1 g/dl
WBC	66,7%	33,3%	6,3 x 10 ⁹ /mm ³	3,4 x 10 ⁹ /mm ³	9,6 x 10 ⁹ /mm ³
Ferro	72,2%	27,8%	97,9 mg/dl	25mg/dl	189 mg/dl

TABELA D
Dosagem de enzimas musculares

Análises	Sem alteração	Alterado	Leitura média
CK	16,5%	83,5%	494,3 U/l
CK-MB	66,7%	33,3%	26,3 U/l
AST	72,2%	27,8%	28,3 U/l
LDH	89%	11%	349,2 U/l

DISCUSSÃO

A hipoglicemia encontrada em nosso estudo (Figura 1) pode ter várias origens como a observada após exagerado esforço muscular (corridas, lutas pugilísticas) e anorexia nervosa. Felig *et al.* (1982), cita que indivíduos saudáveis em jejum quando exercitados a exaustão, comumente apresentam valores de glicose plasmática inferiores aos considerados normais. O esforço físico, certos estados emocionais (apreensão, ansiedade, medo) e o cigarro, dentre outros, podem produzir elevação do teor da glicose plasmática, provavelmente aumentando a glicogenólise hepática por intermédio da hipersecreção de epinefrina (Lima, 1992 e Guyton, 1988). Existem várias patologias que podem gerar um quadro hipoglicêmico, tais como: pan-hipopituitarismo, insuficiência córtico-supra renal aguda, doença de Addison, doença de Von Gierke (hipoglicemia de jejum), galactosemia, frutosemia, sensibilidade à leucina, adenoma das ilhotas de Langerhans, hepatopatias graves, envenenamentos (antihistamínicos, álcool, salicilatos, clorofórmio, fósforo, arsênico, etc.) desnutrição, hipoglicemia funcional (reativa, espontânea, neurogênica) (Miller, 1995 e Tietz, 1995). Uma grande quantidade de substâncias também pode gerar um quadro hipoglicêmico das quais podemos destacar, além da insulina e das substâncias hipoglicemiantes orais, o etanol que atua inibindo a gliconeogênese, e os antagonistas dos receptores b-adrenérgicos, que em pacientes diabéticos impõem risco de hipoglicemia devido a capacidade de inibir o efeito das catecolaminas sobre a gliconeogênese e glicogenólise. Esses agentes também podem mascarar os sintomas mediados pelo sistema simpático associados a queda na glicose sanguínea (*p.ex.*, tremor, palpitações, fraqueza e ansiedade) (Henry, 1995) e os salicilatos que exercem seus efeitos hipoglicemiantes por aumentar a sensibilidade das células pancreáticas a glicose e por potencializar a secreção de insulina. Outras drogas também podem causar hipoglicemia, porém com efeitos mais sutis dentre elas a anfetamina, fenfluramina, indometacina, naproxen, mebendazol, sulfonamidas, tetraciclina, piridoxina, propoxifeno, propranolol e pentamida dentre outras drogas (Goodman & Gilman, 1996; Tietz, 1995 e Hansten, 1978).

Na série branca (Figura 2), a contagem do número total de leucócitos ou glóbulos brancos obtida foi de 22,2% dos valores iguais ou abaixo do limite inferior da normalidade. Os resultados que se apresentaram leucopênicos podem representar possivelmente, processos viróticos (processo gripal) ou simplesmente leucopenias ditas fisiológicas. Houve uma tendência, evidenciada em 11% das alunas, que apresentaram o número de leucócitos totais próximos ao limite superior dos valores de referência denotando a possibilidade de início de infecção bacteriana, estresse ou ainda devido a libe-

ração de adrenalina pela atividade física (Dacie & Lewis, 1975; Guyton, 1988; Tietz, 1995) conforme citado em revisão bibliográfica de Cosendey (1997).

A dosagem do ferro sérico mereceu atenção especial visto ter apresentado níveis baixos e estarem de acordo com os dados obtidos nas análises hematológicas que serão discutidas a seguir. A carência de ferro presente em 27,8% da amostra pesquisada (Tabela C), pode ocorrer na mulher pela perda de ferro durante a menstruação e ser agravada pela dieta pobre em ferro ou falta dos fatores relacionados à sua absorção como as vitaminas B₆, B₁₂, ácido ascórbico e ácido fólico (Campbell & Frisse, 1985; Davidsohn & Henry, 1974; Tietz, 1995). Também podem ser encontrados valores mínimos de ferro até dois dias após exercícios físicos intensos (Glesson *et al.*, 1995). É muito provável que a deficiência de ferro na eritropoiese assim como na anemia ferropriva promovam uma diminuição no desempenho físico (Kleiner, 1998). Contudo, o uso de suplementos de ferro só devem ser prescritos quando a dieta não consegue corrigir a deficiência de ferro, já que os excessos deste mineral inibem a absorção de zinco e, em alguns indivíduos chega a aumentar o risco de câncer, acidente vascular cerebral (AVC) e enfermidade coronariana (Matsudo, 2001), além de ocorrer hemossiderose adquirida com possibilidade de lesão hepática (Henry, 1995).

Na série vermelha foram evidenciadas algumas alterações (Figura 3). Embora a contagem global de hemácias tenha apresentado todos os resultados da amostra analisada compreendidos dentro do intervalo normal (Tabela B), 67% desses valores situaram-se próximos ao limite inferior do intervalo, e o restante das alunas apresentaram contagens dentro dos valores na média esperada. É necessário destacar que os resultados encontrados na hematimetria podem estar falsamente aumentados devido as alunas estarem desidratadas, gerando valores falsamente elevados, pois estavam hemoconcentradas. Galloway (1999), afirma ser a hidratação um fator importante que deve ser considerado antes, durante e depois do exercício.

No caso da dosagem da concentração de hemoglobina, mais de 80% dos resultados obtidos (Figura 4) apresentaram-se menores ou iguais ao limite mínimo para o intervalo de normalidade considerado. O ponto médio obtido para esta dosagem foi de 11,3 g/dl, menor que o limite inferior do intervalo de normalidade, evidenciando quantidades insuficientes de hemoglobina nas hemácias da amostra analisada. A hemoglobina diminui significativamente 24 horas após exercícios fortes, principalmente se estes estiverem associados a nutrição deficiente (Dacie & Lewis, 1975; Kayashima *et al.*, 1995; Cosendey & Gomes, 1994). Segundo Lee *et al.* (1998), a hemoglobina é um parâmetro confiável para o diagnóstico de anemia, pela reprodutibilidade e pre-

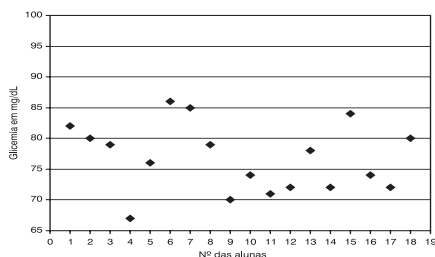


FIG. 1 - Dispersão das concentrações de glicemia nas alunas da 1ª turma da AFA (1996).

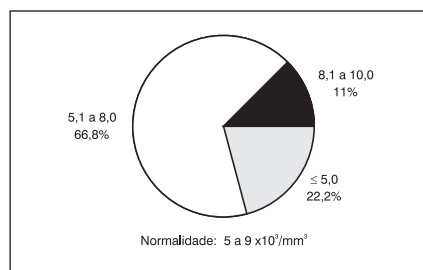


FIG. 2 - Leucometria global (WBC).

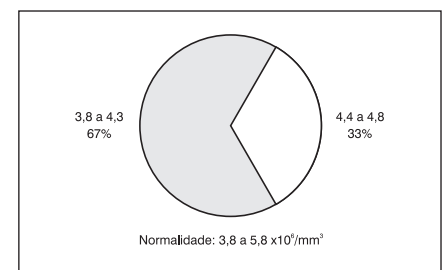


FIG. 3 - Hematimetria (Hm).

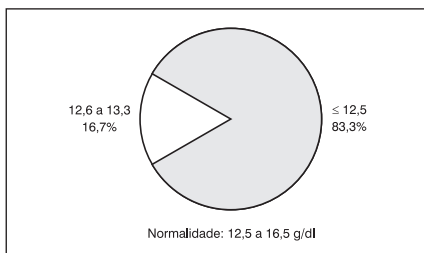


FIG. 4 - Hemoglobina (Hb).

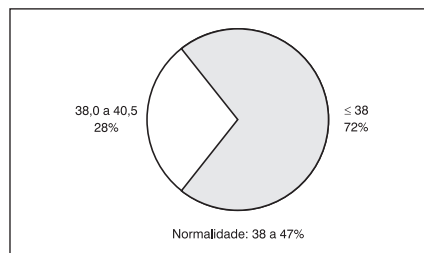


FIG. 5 - Hematócrito (Hct).

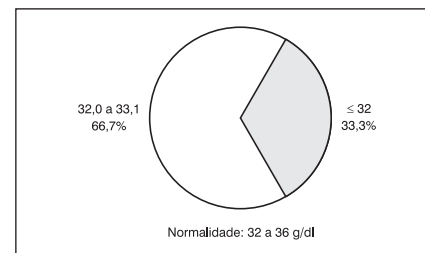


FIG. 6 - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

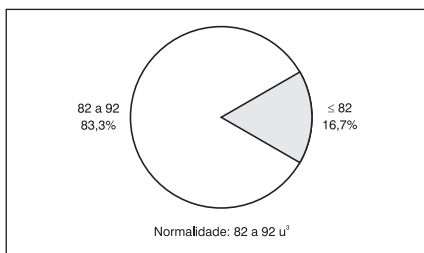


FIG. 7 - Volume Corpuscular Médio (VCM).

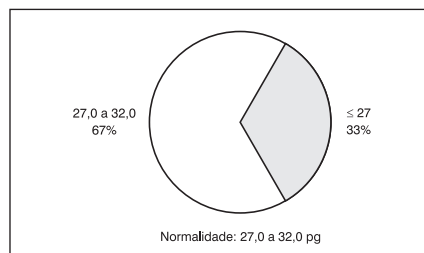


FIG. 8 - Hemoglobina Corpuscular Média (HCM).

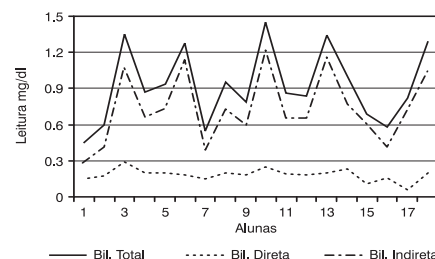


FIG. 9 - Dosagem das bilirubinas.

cisão de sua determinação, constituindo um indicador das conseqüências fisiopatológicas da anemia.

Os valores encontrados na determinação do hematócrito revelaram mais da metade das participantes da amostra (72%) com valores menores ou iguais ao valor mínimo de normalidade considerado (Figura 5). O estudo dos pontos médio e mínimo evidenciaram valores de 36,3% e 27,6%, resultados abaixo do valor mínimo de referência. Assim, com base nos achados do hematócrito e da hemoglobina existe a possibilidade de mais de metade da amostra analisada apresentar tendência a algum tipo de anemia. Como todas as alunas estão, provavelmente, hemoconcentradas, pois grande parte do líquido perdido sob a forma de suor vem do plasma (Eichner, 1996), a correção da hidratação baixará ainda mais os valores, tornando-se crítica uma suplementação.

No estudo dos índices hematimétricos, o Volume Corpuscular Médio (VCM) (Figura 7) apresentou 16,7% dos casos iguais ou abaixo do valor mínimo normal. Já os índices relacionados com a concentração de hemoglobina nas hemácias: Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (Figura 8) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (Figura 6), revelaram percentuais de 33,3% abaixo dos valores normais de referência, sugerindo que essa parte da amostra está com o conteúdo de hemoglobina das hemácias insatisfatório e indicando nesses indivíduos a presença de anemia hipocrômica.

A constatação de estados pré-anêmicos e anêmicos detectada em pelo menos um terço da amostra analisada, com pequena alteração do VCM (Figura 7), constituem as anemias normocíticas. Estas podem evoluir para anemias microcíticas, ferroprivas, pelo esgotamento dos seus estoques de ferro. A carência de alimentos e/ou da alimentação em nutrientes ricos em ferro, vitaminas, fatores que auxiliam na absorção de ferro e a prática de exercícios físicos intensos, podem reduzir o número de hemácias (Dacie & Lewis, 1975; Kayashima *et al.*, 1995; Cosendey & Gomes, 1994).

As dosagens de bilirrubina total apresentaram 33,3% dos seus resultados acima da normalidade, sendo que a bilirrubina indireta encontra-se alterada em 50% dos casos (Figura 9). Os valores alterados de bilir-

rubina indireta indicam microhemólise, possivelmente, causada por exercícios com alto impacto no solo. Pode ocorrer também uma hemólise intravascular, observada em alguns esportes (Eichner, 2001) que é chamada de hemólise desportiva. A ocorrência de lesão e/ou obstruções hepatocanaliculares no fígado foi descartada pela obtenção de valores normais das enzimas hepáticas (AST e ALT) e das enzimas canaliculares (GGT e FALC) (Henry, 1995).

Os resultados encontrados na dosagem da CK (Tabela D), indicam possivelmente, lesão da musculatura estriada por excesso na carga de exercício. A CK é considerada pela maioria dos autores um ótimo indicador de lesão muscular, sendo que estas podem ser produzidas por traumatismos ou exercícios intensos segundo Aizawa *et al.* (1995), Amaladevi *et al.* (1995), Asp e Richter (1995), Brogan *et al.* (1995), Chuang, Lee, e Wang (1995), Dows, Dage e French (1995), Hurley *et al.* (1995) e outros como relata Cosendey (1997).

A AST (aspartato aminotransferase) demonstrou alteração em seus teores em 27,8% dos resultados confirmando a possibilidade de lesão das células da musculatura esquelética.

A LDH (lactado desidrogenase) teve 89% dos resultados dentro da faixa de normalidade, o valor médio ficou em 350 U/I e o restante 11% com valores superiores ao valor normal, sendo que o maior valor obtido foi de 546 U/I confirmando a possibilidade de lesão muscular de acordo com os dados anteriores obtidos através da dosagem de CK e AST.

Pode-se concluir, portanto, que o treinamento aplicado não está sendo bem assimilado pela maioria das alunas, pois ao avaliarmos os valores das dosagens sanguíneas das enzimas musculares, verificamos que o treinamento aplicado vem causando lesões musculares nas alunas há pelo menos 72 horas, uma vez que as enzimas AST e LDH, tiveram seus valores alterados acima dos valores usados como referência (Tabela A). Como estas enzimas apresentam picos enzimáticos no sangue periférico no período entre 24 e 60hs (AST), e entre 48 e 72hs (LDH), e têm seus valores normalizados, dentro da faixa de referência, em 8 e 10 dias, respectivamente, verificamos que o treinamento físico se apresenta estressante e prolongado sem

tempo suficiente para recuperação celular. No dia anterior as coletas sanguíneas, em torno de 24 a 36 horas, houve uma carga de trabalho físico excessivo, conforme resultados apresentados pela enzima CK que tem pico plasmático dentro de 30 hs após esforço extenuante, e cujos valores voltam a faixa de referência dentro de 96 horas após ser cessado o esforço (lesão celular) (Cosendey, 1997).

CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Pollock & Wilmore (1993), sugerem que o treinamento físico deve ser iniciado de forma que o protocolo varie de intensidade baixa a moderada, a menos que se queira preparar para uma competição desportiva onde neste caso, não se seguem critérios. Sugerem ainda que a fim de evitar desânimo e desmotivação, a prescrição de exercícios para indivíduos aparentemente saudáveis deve, dentre outras recomendações, fazer uma avaliação física e laboratorial que analise as condições de saúde antes do início dos trabalhos.

Além das alterações descritas acima, foi verificado por meio de estudos realizados por Leslie Doyal (1995), e conforme fatos documentados em relatórios comunitários de saúde, que a mulher vive mais que o homem, porém, sofre mais de angústias, ansiedades, depressões e diabetes dentre outras patologias e recorre mais aos serviços médicos que os homens.

Sabendo-se disso e avaliando os resultados encontrados, torna-se necessária uma investigação para averiguar se estas alterações são características dos seus próprios processos fisiológicos ou devida a uma associação de atividade física intensa, às perdas durante o ciclo menstrual associados ao estresse da nova situação e a uma alimentação inadequada, caracterizando-se por um baixo consumo de carboidratos, proteínas, vitaminas, e a necessidade de promover-se uma conscientização de reorganização de hábitos alimentares para corrigir essas carências.

Os resultados encontrados neste estudo devem ser ratificados, por exemplo, pela ampliação do universo amostral, uma vez que, o *n* amostral reduzido (apesar de terem sido avaliadas todas as alunas) aumenta o risco dos resultados não refletirem o comportamento da população, contudo o impacto dessa limitação sobre os resultados, ao menos no âmbito da amostra testada, não invalida as observações.

Para minimizar as lesões nos treinamentos e maximizar o rendimento e a performance das militares, recomenda-se a utilização sistemática da monitoração bioquímica-hematológica do condicionamento físico, que por ser um método extremamente sensível, proporcionará uma melhor visualização pelos treinadores, das respostas orgânicas às cargas de trabalho físico, permitindo assim, um respeito aos limites pessoais e a formação de indivíduos mais resistentes e saudáveis ao final do treinamento.

REFERÊNCIAS

1. Aizawa, H.; Morita, K.; Minami, H.; Sasaki, N.; Tobise, K. Exertional rhabdomyolysis as a result of strenuous military training. *J. Neurol. Sci.*, 132(2), 239-40, 1995.
2. Amaladevi, B.; Pagala, S.; Pagala, M.; Namba, T.; Grob D. Effect of alcohol and electrical stimulation on leakage of creatine Kinase from isolated fast and slow muscles of rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19(1), 147-52, 1995.
3. American College of Sports Medicine. *Guidelines for exercise testing and prescription*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.

4. Asp, S.; Dugaard Jr.; Richter, E. A. Eccentric exercise decreases glucose transporter GLUT4 protein in human skeletal muscle. *J. Physiol.*, 482(3), 705-12, 1995.
5. Brasil. Ministério da Aeronáutica. *Boletim Externo do Ministério da Aeronáutica (BMA 113-6)*, Aviso 006/GM3/023 de 4/5/95 publicado em 30/5/95.
6. Brogan Jr, G. X.; Vuori, J.; Friedman, S.; McCuskey, C. F.; Thode Jr, H. C.; Vaananen, H. K.; Cooling, D. S.; Bock, J. L. Improved specificity of myoglobin plus carbonic anhydrase assay versus that of creatine Kinase-MB for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann. Emerg. Med.*, 27(1), 22-8, 1996.
7. Campbell, J. W.; Frisse, M. *Manual de terapêutica clínica*. 24th ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1985.
8. Cosendey, A. E. *Proposta de aprimoramento da utilização de medidas bioquímico-hematológicas como auxílio na avaliação e na orientação em programas de condicionamento físico*. Dissertação de Mestrado, Universidade Gama Filho, UGF, Rio de Janeiro, 1997.
9. Cosendey, A. E.; Gomes, P. S. C. *Utilização de parâmetros bioquímicos/hematológicos na avaliação e orientação do treinamento físico de atletas de alto nível*. In: V. Matsudo (Ed.), *International Symposium on Sports Sciences: Vol. 19. Saúde e desempenho*. p. 134. São Paulo: Celafis, 1994.
10. Cosendey, A. E. *Condicionamento físico na aeronáutica: como aprimorá-lo*. Monografia da Escola de Comando e Estado-Maior da Aeronáutica (ECE-MAR), Universidade da Força Aérea, Rio de Janeiro, 2000.
11. Chuang, C. C.; Lee, S. Y.; Wang, K. T. Impact of exercise on athlete's cardiac muscle evaluated by Troponin T test. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*. 11(3):150-6, 1995.
12. Dacie, J. V.; Lewis, S. M. *Practical haematology*. 5th ed. London: Churchill Livingstone, 1975.
13. Davidsohn, J.; Henry, J. B. *Todd-Sanford: diagnóstico clínico por el laboratorio*. 5th ed. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1974.
14. Doyal, L. *What makes women sick gender and the political economy of health*. London: Macmillian Press LTD, 1995.
15. Dows, T. R.; Dage, R. C.; French, J. F. Reduction in endotoxin-induced organ dysfunction and cytokine secretion by a cyclic nitron antioxidant. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17(7), 571-80, 1995.
16. Eichner, E. R. Anemia do esportista. Terminologia inadequada para um fenômeno real. *Sports Science Exchange*, 8, 1996.
17. Eichner, E. R. *Should I run tomorrow?* Chapter in marathon medicine 2000, Royal Society of Medicine Press (London), in pres, 2001.
18. Felig, P.; Cherif, A.; Minagawa, A. Hypoglicemia during prolonged exercise in normal men. *N. Engl. J. Med.*, 306:895, 1982.
19. Galloway, S. D. Dehydration, rehydration, and exercise in the heat: rehydration strategies for athletic competition. *Can. J. Appl. Physiol.*, 24:188-200, 1999.
20. Gleeson, M.; Almey, J.; Brooks, S.; Cave, R.; Lewis, A.; Griffiths, H. Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 71(2-3), 137-142, 1995.
21. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana Editores S.A., 1996.
22. Guyton, A. C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 6th ed. RJ. Guanabara, 1988.
23. Hansten, P. D. *Interações medicamentosas e os efeitos dos medicamentos nos exames de laboratório*. Rio de Janeiro/São Paulo: Livraria Atheneu, 1978.
24. Henry, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 18th ed. São Paulo: Manole, 1995.
25. Hurley, B. F.; Redmond, R. A.; Pratley, R. E.; Treuth, M. S.; Rogers, M. A.; Goldberg, A. P. Effects of strength training on muscle hypertrophy and muscle cell disruption in older men. *Int. J. Sports Med.*, 16(6), 378-84, 1995.
26. Kayashima, S.; Ohno, H.; Fujioka, T.; Taniguchi, N.; Nagata, N. Leucocytosis as a marker of organ damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 70(5), 413-20, 1995.
27. Kleiner, S. M. O papel da carne na dieta do atleta: seu efeito na inter-relação entre macro e micronutrientes. *Sports Science Exchange*, 16, 1998.
28. Lee, G. R.; Foerster, J.; Greer, J. P.; Paraskevas, F.; Rodgers, G. M. Anemia. General Aspects. 897-907. *Wintrobe's Clinical Haematology*, 1998.
29. Lima, O. A.; Soares, J. B.; Greco, J. B.; Galizzi, J.; Cançado, J. R. *Métodos de laboratório aplicados à clínica - técnica e interpretação*. 7th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1992.
30. Matsudo, S. M. Nutrição, atividade física e desempenho. *Revista Nutrição em Pauta*. Mar/abr: 31-37, 2001.
31. *Military Doctrine*. [S.l.] Air command and staff college, Air University. UNIT III - Command and staff school instructional circular number 59-3, 30 september to 9 october 1958.
32. Miller, O. *Laboratório para o clínico*. 8th ed. São Paulo: Atheneu, 1995.
33. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. *Harper's Biochemistry*. 23rd ed. USA: Prentice-Hall International Inc, 1993.
34. Pollock, M. L.; Wilmore, J. H. *Exercícios na saúde e na doença - avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação*. 2th ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., 1993.
35. Roche Diagnostic Systems Haematology. *User manual Micros STEX-18*. Montpellier: ABX Hematologie, 1995.
36. Roche Diagnostic Systems. *Operator's manual Cobas Mira Plus*. Basel, Suíça, 1992.
37. Schneider, F. *História das doutrinas militares*. [S.l.] Difusão editorial S A, 1975.
38. Tietz, N. W. *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995.

Endereço para correspondência

Dr. Alexandre Elias Cosendey

Laboratório Bioquímica do Esporte

Av. Ayrton Senna, 1850 - cob. 416 - 22775-000 - Rio de Janeiro - RJ

Tel/Fax (0xx21)2430-3455/3456 - E-mail: laboratorio@bioquimicadesporte.com.br

Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA™ 120) para contagem de reticulócitos

Comparative analysis of manual and automated (ADVIA™ 120) reticulocytes counting

Rafael Noal Moresco^{1,2}; Matheus Pereira Valente³; Luís Cláudio Rosa Vargas¹; Sérgio Luís Coletto¹; Liana Morari¹; Rosana Mancuso Defferrari¹ & Rejane Pan Becker¹

RESUMO – Os reticulócitos são células de origem eritróide com resíduos de RNA, sendo esses evidenciados com a utilização de colorações supravitais. O número de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoética da medula óssea. Considerando a importância da implantação de uma contagem de reticulócitos mais rápida e precisa, este trabalho tem por objetivo avaliar a correlação entre as técnicas manual e automatizada (ADVIA™ 120, Bayer Diagnostics) para contagem de reticulócitos. O equipamento ADVIA™ 120 utiliza uma reação citoquímica para a diferenciação e contagem de reticulócitos. Foram utilizadas nesse estudo 64 amostras de sangue obtidas de diferentes pacientes. As contagens foram realizadas pelas técnicas manual e automatizada, sendo que elas variaram de 0,6 a 10%. Ao analisar os resultados obtidos pelas duas técnicas, foi possível observar uma forte correlação ($r=0.9778$, $p<0.001$) entre ambas. A implantação da técnica automatizada tem contribuído com a rotina do Laboratório Central de Análises Clínicas-ISCMPA, fornecendo resultados mais precisos em um menor tempo. A contagem de reticulócitos realizada no ADVIA™ 120 apresentou excelente correlação com a contagem manual, sendo bem mais prática, rápida e precisa.

PALAVRAS-CHAVE – Reticulócitos, contagem automatizada, ADVIA™ 120.

SUMMARY – Reticulocytes are immature cells with RNA residues and they are evidenced using manual technique with supravital coloration. Blood reticulocytes counting reflects the bone marrow activity. Considering the importance of reticulocytes counting, the aim of this study was to evaluate the correlation between manual and automated techniques (ADVIA™ 120, Bayer Diagnostics) for reticulocytes counting. ADVIA™ 120 uses a cytochemical reaction for reticulocytes differentiation and counting. Sixty four blood samples from different patients were evaluated. The countings were accomplished by manual and automated techniques. Results varied from 0,6 to 10%. A strong correlation ($r=0.9778$, $p<0.001$) between manual and automated techniques was observed. The reticulocytes automated counting implantation in Central Laboratory-ISCMPA has contributed to laboratory routine supplying accurate results in smaller time. ADVIA™ 120 reticulocytes automated counting presents an excellent correlation with manual counting and it is more practical, fast and accurate.

KEYWORDS – Reticulocytes, automated counting, ADVIA™ 120.

INTRODUÇÃO

Os reticulócitos são células sangüíneas da linhagem eritróide, em maturação, de tamanho maior do que uma hemácia madura^{5,6,10}, que permanecem na circulação, em média, entre 20 a 40 horas após a liberação pela medula óssea^{2,9,13}. São células anucleadas³, porém, possuem ribossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi^{5,6}. Quando coradas pelos métodos de Wright ou Giemsa, os reticulócitos podem apresentar coloração azul-aczentada, sendo denominados policromatófilos e podem, também, apresentar pequenos agregados de ribossomos citoplasmáticos, fenômeno este descrito como pontilhado basófilo^{6,10}. Colorações supravitais como o azul de cresil brilhante fazem precipitar os restos citoplasmáticos de ácido ribonucleico (RNA). Ao microscópio, os restos de RNA aparecem com aspecto de grânulos de cor azul escura ou na forma de um retículo de mesma cor, o que permite a identificação e a contagem dos reticulócitos^{4,10,11}. Após a metabolização do RNA, os reticulócitos tornam-se eritrócitos maduros².

O número de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoética da medula óssea. O aumento da contagem de reticulócitos representa uma maior liberação de eritrócitos pela medula óssea em resposta a um determinado estímulo desencadeado principalmente pela eritropoetina, sendo, assim, um importante índice no diagnóstico e monitoramento de pacientes anêmicos ou com perda sangüínea. Para fins clínicos, a contagem de reticulócitos é registrada como porcentagem do número total de

células vermelhas na amostra avaliada. Em geral os limites de referência para a contagem de reticulócitos são de 0,8 a 2,5% de todas as células vermelhas em homens, de 0,8 a 4,1% em mulheres e de 4,0 a 7,0% em neonatos⁶. O nível sangüíneo de reticulócitos é igual ao nível medular⁵.

A técnica de contagem manual utilizando coloração supravital⁷ ainda é o procedimento padrão^{5,11}, porém, alguns contadores automatizados já vêm adaptados para contar reticulócitos no mesmo canal de contagem de eritrócitos. Os contadores eletrônicos podem analisar um maior número de amostras em um período de tempo bem menor do que o necessário para a contagem realizada pelo método manual. Desta conveniência, a padronização do procedimento e a eliminação da subjetividade nessa análise são as principais vantagens da metodologia automatizada. Alguns estudos preliminares demonstraram que as técnicas automatizadas têm uma boa precisão, boa reprodutibilidade e fácil execução^{1,8,12}.

Considerando a importância de uma contagem de reticulócitos rápida e confiável, este estudo tem por objetivo verificar a existência de correlação entre as técnicas de contagem de reticulócitos manual e automatizada, buscando o aprimoramento deste processo no Laboratório Central de Análises Clínicas, da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo comparativo entre duas técnicas de contagem de reticulócitos em 64 pacientes, sem

Recebido em 5/11/2002
Aprovado em 9/12/2002

¹Laboratório Central de Análises Clínicas, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; ²Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS; ³Faculdade de Farmácia, PUCRS.

distinção de raça, sexo e idade, no período de setembro a outubro de 2002. Foram incluídos no estudo os pacientes que tiveram a solicitação médica para contagem de reticulócitos e cujas amostras tenham sido enviadas ao Laboratório Central de Análises Clínicas da ISCMPA, para a realização deste exame. Este protocolo de pesquisa foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA (Parecer nº 189/02).

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa e a colheita foi realizada pelo sistema Vacutainer® com a utilização de tubos contendo EDTA. A seguir, foi realizada a contagem de reticulócitos pela técnica manual, com coloração supravital de azul de cresil brilhante e posterior observação da lâmina em microscópio óptico Zeiss Axioskop, em aumento de 1000x. A diferenciação microscópica foi definida a partir do conteúdo citoplasmático dos reticulócitos que apresentam características distintas dos eritrócitos maduros.

A mesma amostra utilizada para a contagem de reticulócitos pela técnica manual também foi submetida à análise no equipamento ADVIA™ 120 (Bayer Diagnostics), que mede a dispersão e absorção de luz nos eritrócitos. A técnica automatizada para contagem de reticulócitos utilizada neste estudo baseia-se em uma reação citoquímica. No primeiro instante, as células vermelhas são isovolumetricamente esferadas pela ação do reagente auto-RETIC (Bayer Diagnostics). Posteriormente, os reticulócitos são diferencialmente corados com o reagente Oxazine 750 (Bayer Diagnostics), baseando-se em seu conteúdo de RNA. A absorção de luz é proporcional ao conteúdo de RNA. O resultado desta técnica para contagem de reticulócitos também é expresso em percentual de reticulócitos em relação às células vermelhas contadas pelo equipamento ADVIA™ 120.

Os resultados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise estatística com a utilização do teste de correlação de Pearson, sendo realizada no programa SPSS 10.0 (Statistical Package for Social Science).

RESULTADOS

Os resultados obtidos pelas técnicas manual e automatizada (ADVIA™ 120) foram analisados para verificar a existência de correlação nas amostras testadas. As contagens de reticulócitos dos pacientes variaram de 0,6 a

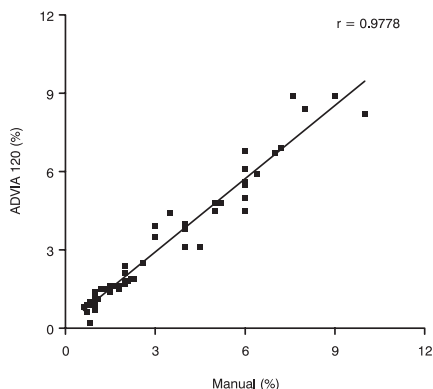


FIG. 1 - Correlação entre as contagens de reticulócitos obtidas pelas técnicas manual e automatizada (ADVIA™ 120); $p < 0.001$.

10%, sendo que a média observada na contagem manual foi de 2,90% e na contagem automatizada foi de 2,82%. Ao analisar os resultados obtidos pelas duas técnicas, foi possível observar uma forte correlação ($r = 0,9778$, $p < 0.001$) entre ambas (Figura 1) e um coeficiente de variação médio de 9,97%.

DISCUSSÃO

A contagem de reticulócitos obtida no equipamento ADVIA™ 120 apresentou excelente correlação com a con-

tagem obtida pela técnica manual com coloração supravital de azul de cresil brilhante, sendo que esta é adotada na grande maioria dos laboratórios de análises clínicas do Brasil que realizam este exame. O avanço tecnológico e a implementação de novos parâmetros nos equipamentos automatizados são progressos que fazem cada vez mais parte do dia-a-dia dos laboratórios clínicos. Pelo uso clínico, é importante que cada parâmetro seja minuciosamente avaliado e comparado com a técnica até então utilizada, antes de ser adotado em algum laboratório.

Os resultados de reticulócitos obtidos no equipamento ADVIA™ 120 foram similares aos observados na contagem pelo método manual. A velocidade no processamento das amostras e a padronização do procedimento são as principais vantagens da tecnologia de automação testada. São eliminadas as variações das contagens ocorridas em função de problemas com a coloração e também interobservadores.

A implantação desta técnica automatizada no Laboratório Central de Análises Clínicas da ISCMPA tem contribuído para a rotina do laboratório, fornecendo resultados mais precisos em um menor tempo. Além disso, os reticulócitos contados no ADVIA™ 120 são classificados de acordo com o seu grau de maturidade, sendo que esta informação não é obtida na técnica manual. Considerando os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a contagem de reticulócitos realizada no ADVIA™ 120 apresenta excelente correlação com a contagem manual, sendo bem mais prática, rápida e precisa.

AGRADECIMENTOS

A toda equipe do Laboratório Central de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e, em especial, ao Dr. Carlos Franco Voegeli pela dedicação, colaboração e apoio dispensados durante a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Buttarelo, M.; Bulian, P.; Farina, G.; Petris, M. G.; Temperin, V.; Toffolo, L. Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction. *American Journal of Clinical Pathology*. 117(6): 871-879; 2002.
2. Failace, R. *Hemograma: manual de interpretação*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1995.
3. Harmening, D. M. *Clinical haematology and fundamentals of haemostasis*. 3ª ed. Philadelphia: F. A. Davis Company. 1997.
4. Henry, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19ª ed. São Paulo: Manole. 1999.
5. Hoffman, R.; Benz, E. J.; Shattil, S. J.; Furie, B.; Cohen, H. J.; Silberstein, L. E. *Haematology: basic principle and practice*. 2ª ed. New York: Churchill Livingstone. 1995.
6. Lee, R. G.; Bithell, T. C.; Foerster, J.; Athens, J. W.; Lukens, J. N. *Win-trobe hematologia clínica*. 1ª ed. São Paulo: Manole. 1998.
7. Lima, A. O.; Soares, J. B.; Greco, J. B.; Galizzi, J.; Cançado, J. R. *Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
8. Peng, L.; Yang, H.; Jiang, H.; Su, J.; Peng, Z. Automated reticulocyte counting using the Sysmex RAM-1. *Clinical and laboratory haematology*. 23(2):97-102. 2001.
9. Rapaport, S. I. *Hematologia: introdução*. 2ª ed. São Paulo: Roca. 1990.
10. Ravel, R. *Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.
11. Sultan, C.; Priolet, G.; Beuzard, Y.; Rosa, R.; Josso, F. *Técnicas em hematologia*. 1ª ed. Barcelona: Toray. 1979.
12. Tarallo, P.; Humbert, J. C.; Fournier, B.; Mahassen, P.; Henny, J. Reticulocytes: reference limits. *Clinical and Laboratory Haematology*. 18(1):13-14. 1996.
13. Verrastro, T.; Lorenzi, T. F.; Wendel Neto, S. *Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. São Paulo: Atheneu. 1996.

Endereço para correspondência

Rafael Noal Moresco

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Laboratório Central de Análises Clínicas

Rua Prof. Annes Dias, 285 - 90020-090 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone: (0xx51)3214-8564

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Influência do estresse nos níveis sanguíneos de lipídios, de ácido ascórbico, de zinco e de outros parâmetros bioquímicos

Stress' influence on blood levels of lipid, ascorbic acid, zinc and other biochemical parameters

G. E. Ronsein¹; R. L. Dutra²; E. L. Silva²; F. Martinello²; E. M. Hermes³; G. Balen⁴; S. Jorge²; C. D. A. Waltrick⁵; C. S. M. Silva⁵; B. M. Santos⁴; V. Leal⁷; R. U. Queiróz² & G. A. Cantos^{*2}

RESUMO – Muitos estudos apontam quanto à possibilidade de que o estresse afete a concentração de lipídeos, de ácido ascórbico, de zinco e de outros parâmetros bioquímicos e que estes elementos devem provocar alterações hormonais e bioquímicas, prejudicando o sistema cardiovascular. Assim, esta pesquisa teve como objetivo verificar o estresse em suas diferentes modalidades: tolerância, tensão, fontes, estado e vulnerabilidade e depois correlacionar as respostas de tais questionários com as alterações bioquímicas propostas em análise. A população examinada foi de 29 pacientes trabalhadores ou estudantes da Universidade Federal de Santa Catarina-Brasil. Observou-se que a maioria das pessoas, da comunidade universitária analisada, convive com problemas de estresse e que os indivíduos mais tolerantes ao estresse são os menos vulneráveis. Da mesma forma, foi possível observar que os indivíduos mais tensos foram aqueles com estado de sofrimento ou sofrimento severo. Para correlação das análises bioquímicas o questionário sobre estado de estresse foi o que mais apresentou alterações significativas com os diversos parâmetros bioquímicos analisados. Nesta pesquisa pode-se notar que os problemas de estresse provocam um aumento de colesterol total e LDL-colesterol e uma pequena diminuição da fração HDL-colesterol, cálcio, magnésio, ácido ascórbico e zinco. Contudo, em nenhum dos questionários utilizados observou-se qualquer correlação entre os problemas de estresse e as análises bioquímicas como o fósforo, sódio, potássio e vitamina B₁₂. Conclui-se que os parâmetros bioquímicos são ferramentas importantes na análise do estresse e que este deve acelerar o curso da aterosclerose coronariana.

PALAVRAS-CHAVE – Estresse, parâmetros bioquímicos, aterosclerose.

SUMMARY – Many surveys rely on the possibility that stress may affect the lipid, ascorbic acid, zinc and other biochemical parameters concentration, and that these elements should be responsible for hormone and biochemical alterations, which causes the malfunction of the cardiovascular system. This research's purpose is to analyse stress in its various aspects: tolerance, tenseness, sources, levels, state vulnerability, and correlate the answers to applied questionnaires with the biochemical modifications under analysis. The analysed population consists of 29 persons, including patients, workers and students at University of Santa Catarina State- Brazil. It was observed that most of the analysed community live with problems of stress and that the most stress - tolerating people are also the less vulnerable ones. The most tense individuals were those submitted to a severe distress or those who were living in a painful condition. Correlation with biochemical analysis showed that the questionnaire about stress state was the one with the most significant alterations concerning the several biochemical parameters analysed. In this research, it was noted that stress problems increases the levels of total cholesterol as well as LDL cholesterol and decreases the HDL cholesterol, calcium, magnesium, ascorbic acid and zinc levels. However, no correlation between biochemical analyses of substances such as phosphorus, sodium, potassium and B₁₂ vitamin and the stress problems found in the questionnaires applied were observed. As a conclusion, it was shown that the biochemical parameters are important tools in stress analyses, and that stress should accelerate the course of coronary arteriosclerosis.

KEYWORDS – Stress, biochemical parameters, arteriosclerosis.

INTRODUÇÃO

O ser humano, por natureza, procura manter um equilíbrio de suas forças internas com todos os órgãos, de maneira que seu organismo possa trabalhar em harmonia. Entretanto, quando esse equilíbrio passa a ser alterado por algum agente estressor, ou seja, por qualquer situação que desperte uma emoção, boa ou má, isto constituirá numa fonte de estres-

se. Os agentes estressantes podem ser classificados como físicos ou psicossociais. Os estímulos físicos vêm do ambiente e incluem: luz calor, frio, odor, fumaças, drogas em geral, lesões corporais, agentes infecciosos e esforços físicos. Já os psicossociais incluem todos os eventos que podem alterar o curso de nossas vidas, como a morte de um parente próximo, a separação, o encarceramento, a aposentadoria, o casamento, os problemas no trabalho, as provas escolares ou mesmo as

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 11/7/2002

*Prêmio UFRJ modalidade Análises Clínicas - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

¹Aluna da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis, SC; ²Professores da UFSC – Florianópolis, SC;

³Bioquímica do Hospital Universitário (HU); ⁴Nutricionista HU – UFSC – Florianópolis, SC; ⁵Cardiologistas HU – UFSC – Florianópolis, SC;

⁶Profissional voluntária de Educação Física; ⁷Aluna de extensão – UFSC – Florianópolis, SC.

mudanças de hábitos em geral (Nahas, 2001). A importância de agentes estressores psicossomáticos hoje é amplamente reconhecida, sendo tão potentes quanto os microorganismos ou a insalubridade, no desencadeamento das doenças. Estima-se que esses agentes chegam a 50% nas regiões mais desenvolvidas, afetando indiferentemente as mais variadas classes sociais (França & Rodrigues, 1999).

Independente do fator causador do estresse, nosso corpo faz um esforço para adaptar-se à nova situação. Contudo, quando os estímulos forem excessivos e por longos períodos, os mesmos podem levar a uma série de complexas reações bioquímicas e fisiológicas, desencadeando situações patológicas (Nahas, 2001). Estudos enfatizam a importância vital no controle do bem estar físico e psicológico, pois a forma como nos relacionamos com o estresse pode estabelecer a diferença entre saúde e doença, vida e morte (Perkins, 1995). O sistema imunológico, responsável pelas reações de defesa do organismo contra infecções, é o mais afetado nas situações de estresse, principalmente quando estas forem prolongadas, pois como consequência levam a diminuição das células linfáticas do timo, dos gânglios linfáticos e mesmo do sangue em circulação, de maneira que o organismo fica sujeito a várias infecções (Black & Garbutt, 2002). Por outro lado, há muitas evidências indicando que os fatores psicológicos têm um papel importante na etiologia e na progressão de certas doenças cardiovasculares tais como aterosclerose (Vitor *et al.*, 1998; Rozanski, *et al.*, 1999; Black & Garbutt, 2002).

Em adição, numerosos estudos consideram que o estresse provoca altos níveis de colesterol total, LDL-colesterol e diminuição de HDL-colesterol, sugerindo um aumento de doenças cardiovasculares (Roy *et al.*, 2001). Contudo, o estresse como variável independente, não tem sido confirmado, mas somente quando associado a outros fatores de risco como tabagismo, sedentarismo, hipertensão e dieta inadequada (Paiva, 1983; Pearson *et al.*, 1997; Michelson & Moriguchi, 1999). A despeito disto, pesquisas mostram uma associação entre estresse e hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (Newman *et al.*, 1986). Sabe-se que em momentos de estresse a pressão arterial sobe, isto tanto no normotenso quanto no hipertenso, pois a mesma representa o produto da resistência periférica versus débito cardíaco. Soma-se a isto o fato de que o estado de alerta constante pode levar ao desenvolvimento de hipertensão arterial, sendo que o sistema simpático que desencadeia a pressão arterial ocorre por eventos estressantes (Lipp & Rocha, 1996).

A secreção de hormônios esteróides do córtex adrenal bem como as catecolaminas da medula adrenal é estimulada pelo estresse. Essas substâncias vão agir diretamente na área estimulada e reduzir o ritmo excessivo de sua atuação. Tal resposta é perfeitamente adequada quando o fator de estresse requer uma liberação extra de energia para determinada situação. Contudo, a manutenção de altos níveis de açúcar na corrente sanguínea pode levar ao diabetes futuro. Além do mais, o estresse, particularmente o agudo, pode exacerbar à condição diabética preexistente, pois os diabéticos são incapazes de suprir, por rápidas altera-

ções, as exigências de insulina resultantes do estresse continuado. Diga-se que o estresse por si só pode levar a outras complicações graves, como cardiovasculares (Mello Filho, 2001).

O estresse têm efeito também na alimentação, podendo modificar o metabolismo de vários nutrientes como vitaminas do complexo B, vitamina C, cálcio, magnésio, ferro e zinco (Combs, 1998; Lipp & Rocha, 1996). Adicionalmente, quando estamos estressados, tendemos a negligenciar nossa dieta e, então, piorar essa condição patológica pela ingestão inadequada de minerais. As deficiências desses minerais estão ligadas a uma grande variedade de disfunções, que vão desde a infertilidade e redução do crescimento, à úlcera, à hipertensão arterial e à doença isquêmica do coração (Mello Filho, 2001).

O estresse leva a uma depleção de zinco no fígado, no músculo e aumento da excreção urinária deste elemento (Gonzalez *et al.*, 1998) afetando também o fator inibitório de crescimento. (Giralt *et al.*, 2000). Outros estudos mostram que a deficiência de zinco desenvolve danos oxidativos associados com inflamação (Rossi, *et al.*, 2000) e parece acelerar também a divisão celular no intestino, reforçando a membrana da mucosa gastrointestinal, sendo o mesmo usado para o tratamento de úlceras (Melo, F., 2001). Outros trabalhos mostram que, em ratos, o zinco está envolvido na estimulação de genes que levam a liberação de adrenais (Honkaniemi *et al.*, 2000). O zinco é essencial também na estrutura óssea. Estudos mostraram que a quebra de estresse modula a deformidade dos parâmetros medidos, em relação ao comprimento e diâmetro da coluna espinal (Rossi *et al.* 2000).

Pesquisas têm demonstrado que pessoas estressadas do tipo agressivas, ambiciosas, competitivas, que vivem sob tensão têm constante déficit do magnésio muscular. Portanto, uma ingestão adequada de magnésio é essencial para manter as artérias relaxadas, diminuir a pressão arterial e tornar os batimentos cardíacos regulares (Shivakumar & Kumar, 1997). Este mineral, reduz ainda os radicais livres, estabilizando a capacidade de aglutinação de plaquetas sanguíneas. Assim, a carência desse elemento leva o indivíduo a ter maiores chances de formação de trombos (Marinez & Lourenço, 1996; Garcia *et al.*, 1998). A deficiência desta substância no organismo pode levar ainda à anorexia, apatia, náuseas, hiperatividade neuromuscular, que se não for tratada pode provocar arritmias cardíacas ou mesmo parada cardíaca (Henrotte, *et al.*, 1997).

O estresse altera também o metabolismo do cálcio e sódio interferindo na reatividade vascular. A regulação do metabolismo destes elementos é extremamente complexa, os quais interagem com hormônios e excreção renal. A ausência de cálcio diminui a reatividade vascular, enquanto o excesso de sódio aumenta a reatividade muscular das artérias. O cálcio é necessário para que haja contração dos músculos que compõe as paredes das pequenas artérias. Este íon causa a contração simultânea das proteínas, miosina e actina, fazendo a célula contrair e relaxar. Como os *fatores de relaxamento* no exterior da célula têm uma afinidade com o cálcio, ele logo é removido da célula muscular,

permitindo o relaxamento da mesma (Henrotte *et al.*, 1997). O cálcio afeta também o marca-passo que controla a frequência cardíaca (Rocha & Lipp, 1996), sendo também importante na absorção de vitamina B, através da parede do intestino delgado (Lipp *et al.*, 1986).

Em relação ao ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, este tem sido altamente consumido como suplemento alimentar como forma de prevenir ou combater os resfriados, as doenças cardiovasculares e as neoplasias (Silva *et al.*, 2000). Sua função antiaterogênica deve-se às suas características antioxidantes, as quais podem reduzir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade conhecida como LDL-colesterol (Valkonen & Kuusi, 2000). A proteção completa desta fração parece envolver também a vitamina E, sendo que esta é importante na extinção de radicais produzidos no interior da partícula de LDL-colesterol. Na verdade, a ação da vitamina E parece ser dependente da presença de ácido ascórbico e talvez de outros antioxidantes solúveis (Price *et al.*, 2001). Desta maneira, o ácido ascórbico pode contribuir para a proteção contra doenças coronarianas em pessoas que ingerem altas quantidades de vitamina C através de frutas e vegetais (Gale *et al.*, 1993), embora esta vitamina não tenha sido recomendada como um agente redutor de lipoproteínas (Jenner, *et al.*, 2000). Por outro lado, o fato da deficiência de vitamina C promover a formação de lesões ateroscleróticas em porcos da Índia pode suportar a hipótese que a mesma reduz o risco aterogênico. Atualmente existem fracas evidências destes efeitos em humanos (Combs, 1998). Apesar disto, muitos estudos têm relatado que o ácido ascórbico pode aumentar as concentrações de HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) e diminuir as concentrações de colesterol total (Simon & Hudes, 1999).

No presente estudo foi realizada uma quantificação de colesterol total, triglicerídios, lipoproteínas, cálcio, fósforo, magnésio, vitamina B₁₂, vitamina C, sódio, potássio e zinco de indivíduos atendidos no Hospital Universitário da UFSC, de maneira a correlacionar esses parâmetros bioquímicos com a condição de estresse, em suas diferentes modalidades.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Esta pesquisa foi realizada entre os meses de novembro e dezembro de 2001. Os pacientes que participaram da mesma foram indivíduos da comunidade: estudantes (graduação e pós-graduação), professores, servidores, sendo que 40 % desses pacientes estavam inseridos no Núcleo multiprofissional e interdisciplinar na prevenção e tratamento de eventos cardiovasculares da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Hospital Universitário (HU). A faixa etária variou entre 21 e 75 anos, sendo 24 mulheres e 5 homens. Todos indivíduos que concordaram em participar espontaneamente desta pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e tiveram acesso a todos os seus resultados.

Determinações laboratoriais

As análises laboratoriais foram executadas pelo setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU), exceto o zinco que foi determinado no Departamento de Química da UFSC, e o ácido ascórbico que foi dosado no Laboratório Didático de Bioquímica Clínica da UFSC. O sangue foi obtido por punção venosa, observando-se um jejum de 12 horas. O soro foi obtido por centrifugação do sangue a 2500 rpm por 15 min.

O perfil lipídico foi definido pela determinações do: colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) utilizando métodos enzimático - colorimétrico automatizado; a fração HDL-colesterol (HDL), pelo método de precipitação seletiva acoplado a dosagem por método enzimático colorimétrico automatizado e a fração LDL-colesterol (LDL) foi obtida por cálculo utilizando a fórmula de Friedewald.

Os íons magnésio (Mg), fósforo (P) e cálcio (Ca) foram dosados por método automatizado, sendo que o íon magnésio foi complexado com MTB (azul de metiltimol); o fósforo foi determinado complexando-o com molibdato; o cálcio foi dosado pelo método da o-cresoftaleína e os íons sódio (Na) e potássio (K) foram determinados usando eletrodos íons seletivos, por método automatizado.

O aparelho utilizado para todas as determinações automatizadas acima descritas foi o Dade Dimension[®] AR/Clinical Chemistry System (Dade International Inc. / Dade Behring Inc., Newark, DE - USA). Os Kits usados para as determinações acima foram fornecidos pela Dade Chemistry System Inc. (Dade Behring Inc., Newark, DE - USA).

Todas essas determinações foram executadas utilizando-se o programa de Controle de Qualidade da Control-Lab (Rio de Janeiro-Brasil), da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e o programa PNCQ, da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

A concentração de zinco (Zn) no soro foi determinada em triplicata por espectrometria de absorção atômica Varian Spectra AA 50, equipado com atomizador em chama e lâmpada de cátodo oco para zinco. Para determinação do zinco foi construída uma curva padrão e quatro amostras de calibração para a técnica com adição do analito, com leituras em triplicada, plotando-se o sinal analítico obtido versus concentração

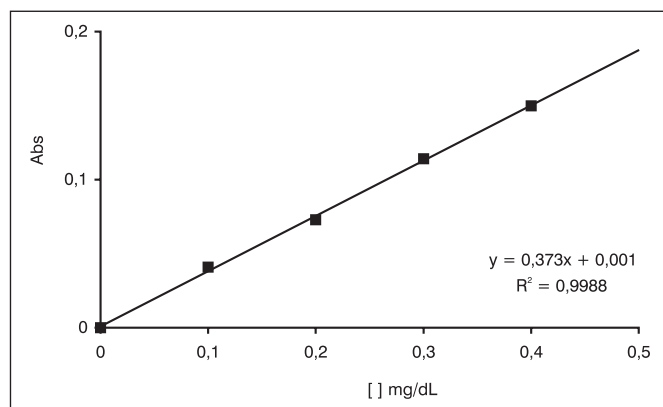


FIG. 1 - Curva de calibração usada para a determinação de ácido ascórbico no soro dos pacientes analisados.

TABELA I
Avaliação do estresse e parâmetros bioquímicos

Nº	Vit C	CT	LDL	Mg/dL					Na	K	B ₁₂ Pg/ml	Zn Mg/L ⁻¹	A	B	C	D
				HDL	TG	Ca	P	Mg								
1	1,38	235	169	45	103	8,5	3,3	1,6	143	4,0	360	1,3	2	-	-	-
2	0,58	171	100	48	112	9,4	-	1,6	142	4,5	241	1,2	3	1	2	1
3	2,66	224	154	47	116	8,6	3,4	2,1	144	3,6	725	1,0	4	1	3	1
4	0,94	238	55	63	8,7	3,0	2,0	144	4,1	-	1,2	0	3	1	1	
5	0,5	236	186	34	82	-	-	-	-	-	439	0,8	4	2	3	1
6	1,34	185	124	46	77	-	-	-	-	-	328	1,3	2	2	1	1
7	1,65	129	62	49	90	8,8	-	1,7	143	4,3	277	1,0	0	2	1	1
8	1,68	199	118	60	106	9,4	4,4	1,6	143	4,2	343	1,2	2	2	2	1
9	2,35	255	177	48	152	8,5	3,9	1,8	143	4,5	324	1,3	0	2	1	1
10	1,21	152	91	48	62	8,5	4,0	1,6	143	4,0	583	0,9	3	2	2	1
11	2,28	230	170	44	80	8,8	3,8	1,7	142	4,4	338	1,2	2	3	2	1
12	2,42	188	111	59	89	8,1	4,6	1,8	143	4,2	230	1,3	1	2	1	1
13	2,15	153	91	48	68	8,6	-	1,6	-	4,1	794	1,3	0	2	1	0
14	1,83	214	145	54	75	9,1	4,5	2,0	143	5,0	547	1,3	0	0	1	0
15	0,88	164	105	46	64	9,3	4,9	1,8	144	4,9	164	1,3	3	2	2	1
16	2,38	251	190	40	108	8,4	3,1	1,8	144	4,5	737	1,1	3	0	3	1
17	1,53	180	125	43	60	8,3	-	1,6	141	4,3	240	1,2	4	0	2	2
18	-	225	164	42	93	8,1	3,1	1,8	144	4,2	381	1,1	4	1	2	1
19	2,23	176	-	35	132	8,5	3,8	1,9	143	4,5	-	1,2	1	3	1	0
20	2,07	207	142	51	68	-	-	-	-	-	-	1,3	4	0	-	1
21	0,54	268	169	80	96	-	-	-	-	-	-	-	0	3	2	0
22	1,36	330	258	43	144	-	-	-	-	-	-	-	0	3	1	0
23	0,04	318	233	24	303	-	-	-	-	-	-	-	4	1	2	1
24	037	277	198	63	79	-	-	-	-	-	-	-	0	2	2	0
25	-	224	141	25	289	9	5	1,6	140	5,0	-	-	4	-	3	1
26	-	244	188	33	117	9,7	-	2,1	150	-	-	-	3	2	1	0
27	0,43	240	160	34	229	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	1
28	-	188	127	27	170	-	-	-	-	-	-	-	1	0	2	0
29	1,81	285	203	54	141	-	-	-	-	-	-	3	2	2	1	

Onde, N, representa os pacientes em questão; A, o estado de estresse (0 significa bem estar; 1, estado marginal; 2, problemas de estresse; 3, sofrimento; 4, sofrimento sério e 5, sofrimento severo); B, tolerância ao estresse, (3, tudo está bem; 2, o indivíduo pode ficar razoavelmente satisfeito com seu estilo de vida; 1, pode fazer melhor e 0 mudanças interessantes são necessárias); C, tensão (1, a pessoa tem um nível moderado de tensão que pode ser melhorado; 2, há muita tensão e 3, provavelmente a pessoa está se sentindo muito desconfortável e com certeza seria ótimo se tentasse mudar); D, vulnerabilidade ao estresse (0, o indivíduo está no caminho certo; 1, a pessoa poderia reagir de forma mais tranqüila; 2, a pessoa encontra-se vulnerável a este tipo de estresse).

e massa. Para a construção da curva de calibração utilizou-se uma solução de óxido de zinco a 0,1 mgL⁻¹ para um volume final de 3ml.

A vitamina B₁₂ (vit B₁₂) foi medida com analisador automatizado Immulite por um imunoenensaio competitivo.

O ácido ascórbico (vit C) presentes na amostra de soro foi determinado imediatamente após a coleta ou em tempo inferior a 3 horas (Burtis & Ashwood, 1999), utilizando-se o método espectrofotométrico da 2-4 di-nitrofenil-hidrazina (McCormick & Green, 1994). O ácido ascórbico e ácido tricloroacético (TCA) foram obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e os demais reagentes utilizados foram de marcas nacionais. Para esta pesquisa após a separação do soro as amostras foram precipitadas com TCA 12% e em seguida analisadas, utilizando uma curva de calibração conforme mostra a Figura 1.

Avaliação do estresse

A determinação do estado de estresse foi realizada segundo pesquisas de âmbito nacional nos Estados

Unidos (Lipp, 1886); a vulnerabilidade ao estresse foi analisada considerando o trabalho desenvolvido pelo Departamento de Saúde, Educação e Bem-estar do Serviço de Saúde pública dos Estados Unidos o qual foi Adaptado por Nahas, (2001); a tensão "Você se sente muito estressado", foi avaliada segundo questionário Simon (2000); a avaliação do estado físico de acordo com o questionário formulado por Boucher & Binette (1996); as fontes de estresse de acordo com o questionário de Levy, (1971) e o reconhecimento dos sinais de estresse conforme sugerido por Lipp *et. al*, (1986).

RESULTADOS

As respostas dos questionários de estresse juntamente com os resultados das análises bioquímicas dos pacientes estão representados na Tabela I.

DISCUSSÃO

Sabe-se que um dos problemas mais comum que afeta o ser humano é o estresse, o qual culmina num desgaste geral do organismo. Se o estresse for bem

compreendido e controlado pode até certo ponto ser bom, pois prepara o organismo para situações difíceis da vida, mas se não for controlado e se estiver constantemente na pessoa, pode levar a alterações no metabolismo de lipídeos, da pressão arterial, dos batimentos cardíacos, ao maior consumo de oxigênio pelo miocárdio e com o tempo reduz o ritmo cardíaco diminuindo a resistência vascular periférica (Hubard & Workman, 2000). Progressivamente esses problemas levam ao aumento de doenças cardiovasculares (Grosman & Sveback, 1987; Deslitaly *et al.*, 1992; Dadak *et al.*, 1995; Vitor, *et al.*, 1998).

Assim, é importante aprender a reconhecer os sintomas do estresse, como primeiro passo para se evitar seus efeitos maléficos, pois é muito comum que o estresse não seja diagnosticado e que o mal se agrave com o passar do tempo e com a falta de tratamento adequado. Desta forma, a primeira proposta deste trabalho foi verificar como o estresse tem afetado a vida de pessoas da comunidade universitária, quais são os principais agentes estressores, quais são os sintomas já manifestos e qual o reflexo bioquímico deste processo. Assim, utilizou-se vários questionários, de maneira a se obter uma avaliação quanto as fontes, os sinais, a tolerância, a vulnerabilidade e o estado de estresse de cada indivíduo. Numa etapa seguinte correlacionou-se os resultados desses questionários com os seguintes parâmetros bioquímicos: CT, HDL, LDL, TG, Ca, PMg, Na, K, vit B₁₂, vit C e Zn.

Há uma longa tradição nas pesquisas sobre estresse em caracterizar os acontecimentos mais estressantes (França & Rodrigues, 1999). Assim, neste trabalho, de acordo com as respostas do questionário de Levy (1971), observou-se que nos últimos 12 meses as principais fontes de estresse foram de ordem psicossociais, sendo que as mais relatadas foram: morte ou doença de alguém da família, acréscimo ou diminuição de pessoas morando em casa, recebimento de multa ao cometer pequenas infrações e mudanças de ordens diversas como: no trabalho, na condição financeira, nos hábitos pessoais, na alimentação e nos hábitos de dormir.

Para Chopra (1989), a presença constante de agentes estressores na maioria dos indivíduos e a maneira com que os mesmos reagem em situações potencialmente estressantes, pode ter profundo efeito sobre suas funções vitais. Alguns sintomas de estresse são fáceis de serem identificados, como mãos suadas, contração dos músculos, respiração rápida do coração "batedeira", acidez do estômago, falta de apetite ou dor de cabeça. Outros sintomas são tão sutis que a pessoa às vezes nem se apercebe deles. O impacto de um agente estressor depende em grande parte das características da pessoa exposta a este agente (Tsopanakis & Tsopanakis, 1998). Os sintomas diferem também dependendo da fase em que o estresse esteja. Assim foi aplicado um questionário de Lipp *et al.*, (1986), para que o indivíduo pudesse reconhecer os sinais de estresse. Os seguintes sintomas foram os mais assinalados: problemas com a memória, nó no estômago, mudança de apetite, músculos tensos, vontade de fugir de tudo, pensar continuamente num só assunto, irritabilidade excessiva, angústia ou ansiedade, hipersensibilidade emotiva e perda do senso de humor.

É importante que o indivíduo reconheça o grau de tolerância ou resistência pessoal em situações de estresse. Cabe dizer que cada pessoa responde de forma peculiar a situações de estresse, o que pode representar um grande problema para uns, pode ser gerenciado com tranquilidade por outros. Para Hans Seley (1974), cada pessoa leva consigo uma capacidade de resistir ao estresse. A essa capacidade ele chamou de energia de adaptação e, segundo esse pesquisador, o indivíduo pode treinar seu organismo, de maneira a desenvolver tal energia, enfrentando melhor às situações de estresse. Neste trabalho pode-se observar que os indivíduos menos vulneráveis ao estresse foram também os mais tolerantes, tal como mostram os pacientes 13, 14, 19, 21, 22, 24 e 26. Analogamente o paciente 17 apresentou menor nível de tolerância e maior vulnerabilidade ao estresse.

O estresse pode ser observado como processo, que é a tensão diante de uma situação de desafio por ameaça ou conquista ou como estado, que é o resultado positivo (Eustresse) ou negativo (Distresse) do esforço gerado pela tensão mobilizada pela pessoa (França & Rodrigues, 1999). Assim, neste trabalho, o questionário proposto por Rochele Simons coloca todos indivíduos, no mínimo, em uma situação de moderada tensão, mas nem sempre esta tensão ou mesmo vulnerabilidade que os indivíduos apresentam frente aos agentes estressores refletem em um estado de desequilíbrio e sofrimento para pessoa, a exemplo dos pacientes 21 e 24 que vivem com muita tensão, mas não apresentam problemas causados pelo estresse. Quando se correlacionou o estado de estresse com tensão, observou-se que os pacientes, 3, 5, 16 e 25 com sofrimento ou sofrimento severo são àqueles que apresentaram mais tensão. Situação inversa observou-se nos pacientes 4, 7, 9, 13 e 14. Essas avaliações mostram que o questionário sobre estado de estresse proposto por Lipp *et al.*, (1986), é o que mais retrata as reações resultantes do estresse, e que este apresenta correlações significativas em relação à tensão, à tolerância e à vulnerabilidade ao estresse.

Esse importante aspecto em relação ao estado de estresse nos obriga a repensar no próprio conceito de estresse, onde o mesmo não poderia ser definido como estímulo ou resposta, mas a maneira pela qual a pessoa avalia e enfrenta esse estímulo. Dentro deste contexto, o estresse pode ser considerado como o protótipo da situação metabólica que desvia o funcionamento dos nossos órgãos e sistemas corporais responsáveis pelos sintomas manifestos (Alves, 2000). Considera-se que dentre as funções fisiológicas, as alterações bioquímicas são as que mais refletem a compreensão dos mecanismos que levam às perturbações dos órgãos.

Assim, comparando os dados de estresse com parâmetros bioquímicos, a literatura mostra que altos níveis de estresse provocam aumento de CT, LDL e diminuição de HDL sugerindo aumento de doenças cardiovasculares (Devlin, 2000; Roy *et al.*, 2001). Nesta pesquisa pode-se observar que dos indivíduos que apresentaram sofrimento sério ao estresse somente um (17) teve valores de CT e LDL dentro dos limites de referências e os demais (3, 5, 17, 18, 20, 23 e 25) apre-

sentaram valores elevados. Similarmente todos os pacientes (3, 5, 16 e 25) que apresentaram altos níveis de tensão e se sentiam altamente desconfortáveis apresentaram CT e LDL acima do desejado. Em relação a tolerância ao estresse pode-se notar que todos os indivíduos (14, 16, 20, e 24) com tolerância zero ao estresse também apresentaram CT e LDL acima do desejado, exceto o indivíduo 17. Tal como relata a literatura (Doornen *et al.*, 1998), nesta pesquisa não foi encontrado correlação entre estresse e triglicérides e pouca correlação com a fração HDL. Em relação à vulnerabilidade, embora este parâmetro sirva para avaliar as situações de estresse associados à frustração ou inibição de um determinado desejo, não foi possível correlacionar tais sentimentos com as análises bioquímicas realizadas.

O estresse e eletrólitos tais como o cálcio, o magnésio e o fósforo têm sido correlacionados com problemas cardiovasculares. Em animais, tem sido sugerido que a deficiência de magnésio aumenta o estresse oxidativo e provoca injúrias vascular (Shivakumar & Kumar, 1997). Embora haja controvérsias, no enfarte de miocárdio agudo a terapia incluindo magnésio tem sido recomendada, pois acredita-se que o mesmo possa contribuir para revascularização coronária (Roger, 1995). Diga-se que no estresse agudo geralmente há uma elevação da pressão sistólica associada a um aumento de sódio e magnésio e diminuição de potássio das células sanguíneas e concentração de cálcio no soro (Mahboob *et al.*, 1996). Nesta pesquisa pode-se notar que o indivíduo 3 (com sofrimento severo) apresentou os níveis de cálcio e magnésio abaixo do esperado e similar relação para o cálcio pode-se observar nos indivíduos 17 e 18. Entretanto, nenhuma correlação foi encontrada com o fósforo, sódio e potássio.

Considerando-se a importância da vit C como antioxidante, este trabalho se propôs também a determinar a concentração deste elemento no soro dos pacientes em questão. Observou-se que dos 25 pacientes, os quais a vit C foi dosada, seis indivíduos (2, 5, 21, 23, 24 e 27) obtiveram baixos níveis deste elemento ou valores no limiar inferior do mesmo que é de 0,5 a 1,5 mg/dl.

A síntese de vit C foi negativamente relacionada com as concentrações de LDL e positivamente relacionada às concentrações de HDL (Price, *et al.*, 2001). Nesta pesquisa, dos seis indivíduos que apresentaram baixas concentrações de vit C, somente dois (21 e 24) não apresentaram problemas de estresse, e somente o paciente 2 obteve resultados de colesterol e LDL normais. Em relação a HDL, somente três pacientes (5, 25 e 27) apresentaram diminuição desta fração. Neste trabalho não foi possível observar nenhuma correlação entre os valores de TG e vit C.

Em relação aos valores encontrados de Zn e demais parâmetros bioquímicos estudos indicam que a deficiência de Zn aumenta os valores de lipídios e LDL e reduz a fração HDL (El Hendy *et al.*, 2001). Neste trabalho pode-se observar que a maioria dos pacientes apresentaram valores de Zn dentro dos limites especificados pela literatura ou seja entre 1.0 a 1.4 mgL⁻¹ (Kocaturk *et al.*, 2000). Destaca-se contudo que dois pacientes (5 e 10) apresentaram concentrações de Zn

abaixo dos valores de referência e que as respostas dos questionários de estresse dos mesmos mostraram: sofrimento ou sofrimento sério, muitas tensões em suas vidas, uma certa vulnerabilidade ao estresse e pouca satisfação com seus estilos de vida. Dentro do limite mínimo de referência para ao zinco, também o paciente 3 apresentou sofrimento sério, pouca tolerância, desconforto e uma certa vulnerabilidade ao estresse. O paciente 5 apresentou CT e LDL elevados e HDL diminuída. Quanto ao paciente 10, este apresentou zinco diminuído e os parâmetros lipídicos dentro da faixa de normalidade. Constatou-se, contudo, que este último paciente faz exercícios diários e controle alimentar. De fato, a atividade física e uma alimentação adequada são fatores que modificam outros fatores de risco para doenças cardiovasculares, pois auxiliam na redução de peso, aumentam a HDL, diminui o TG e os risco para trombose (Michelon & Moriguchi, 1999).

Conclui-se que a maioria das pessoas da comunidade universitária analisada apresenta problemas de estresse, e que decorrente deste processo alterações bioquímicas podem ser observadas, sendo que estas poderão servir de alerta para o indivíduos que vivem constantemente com estímulos estressantes.

REFERÊNCIAS

1. Alves, G. L. B. *A consciência do stress*, Ed. Souza, Curitiba-PR, pp.183, 2000.
2. Black, P. H.; Garbutt, L. D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosomatic Research*, v.52, n.1, p.1-23, 2002.
3. Boucher, F.; Binette, A. *Vença o estresse*. Editora Loyola: SP, p.667, 1996.
4. Burtis, C.; Ashwood, E. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.1023-1028, 1999.
5. Canali, R.; Vignolini, F.; Nobili, F.; Mengheri, E. Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC). *Free Radical in Biology and Medicine*, v.28, n.11, p. 1661-1670, 2000.
6. Chopra, D. *Conexão Saúde: como ativar as energias positivas do seu organismo e ter saúde perfeita*. Ed. Best Seller, São Paulo-SP, 256 pp, 1989.
7. Combs, G. F. *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health*. 2nd ed. Academic Press, New York: p. 246-275, 1998.
8. Dadak, N.; Quyyumi, A. A.; Eisenhofer, G. *et al.* Symptomatically mediated effects of mental stress on the cardiac microcirculation of patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, v.76, n.125, 1995.
9. Deslistraty, U.; Fagius, J.; Wallin, B. G. *et al.* Cardiovascular reactivity in type A and type B males to mental arithmetic on aerobic exercise at equivalent oxygen uptake. *Psychophysiol.* v.29, n.264, 1992.
10. Devlin, T. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Ed. Edgard Bluncher, São Paulo-SP, 957 pp, 2000.
11. Doornen, L.; Sniieder, H.; Boomsma, D. Serum lipids and cardiovascular reactivity to stress. *Biol. Psychol.* v.47, n.3, p.279-297, 1998.
12. El Hendy, H. A.; Yousef, M. J.; El Naga, N. L. A. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. *Toxicol.* v.167, p.163-170, 2001.
13. França, A. C. L.; Rodriguez A. L. *Stress e trabalho*. 2^a ed. Ed. Atlas, São Paulo-SP, 154pp, 1999.
14. Gale, C. R.; Martyn, C. N.; Winter, P. D.; Cooper, C. Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people. *Br. Med. J.* v.310, p.1563-1569, 1995.
15. Garcia, L. A.; Dejong, S. C.; Martin, S. M.; Smith, R. S.; Buettner, G. R.; Kerber, M. D. Magnesium reduces radicals in an coronary occlusion-perfusion model. *J. Amer. Coll. Card.* v.32, n.2, p:536-539, 1998.
16. Giralt, M.; Molinero, A.; Carrasco, J.; Hidalgo, J. Effect of dietary zinc deficiency on brain metallothionein – I and III mRNA levels during stress and inflammation. *Neurochem. Internat.* v. 36, p. 555 -562, 2000.
17. Gonzales-Reimers, E.; Martinez-Riera, A.; Santolaria-Fernandez, F. *et al.* Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, Koper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *J. Format-PDF* (162K) v.16, p.7-12, 1998.
18. Grosman, P.; Svebak, S. Respiratory sinus arrhythmia a index of parasympathetic cardiac control during active coping. *Psychophysiol.*, v.24, p.228, 1987.
19. Henrotte, J.; Franch, G.; Santarromana, M.; Frances, H.; Mouton, D.; Motta, R. Mice selects for low and high blood magnesium levels: a new model for stress studies. *Physiology & Behaviour*, v.61, n.5, p.653-658, 1997.
20. Honkaniemi, J.; Zhang, J.; Longo, F.; Sharp, F. Stress induces zinc finger immediate early genes in rat adrenal gland. *Brain-Research*, v.877, n.2, p.203-208, 2000.
21. Huang, Y.-L.; Sep, J.-Y.; Lin, T.-H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin. Biochem.* v.32, p.131-136, 1999.

22. **Hubbard, J. R.; Workman, E. A. W.** *Handbook of stress an organ system aproach*. CRC Press, Boca Raton, New York, 2000.
23. **Jenner, J. L.; Jacques, P. F.; Seman, L. J.; Schaefer, E. J.** Ascorbic acid supplementation does not lower plasma lipoprotein(a) concentrations. *Atherosclerosis*, v.51, p.541-544, 2000.
24. **Kocaturk, P. A.; Akbostanci, M. C.; Tan, F.; Kavas, G. O.** Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Journal Format -PDF (923 K)*, v.7, p:63-67, 2000.
25. **Levy, L.** *Society, stress and disease*. Oxford Univ. Press, v.1, Londres, 1971.
26. **Lipp, M. N.; Romano, A. S. P. F.; Covolan, M. A.; Nery, M. J. G. S.** *Como enfrentar o estresse*. Ed. da Universidade de Campinas, Campinas, SP, 1986.
27. **Lipp, M.; Rocha, J. C.** *Estresse, hipertensão arterial e qualidade de vida*. Papyrus Editora, Campinas, São Paulo, 1996.
28. **Mahboob, T.; Haleem, D.; Mumtaz, M.; Haleem, M.** Stress and hypertension: role of serum, red cell and tissue electrolytes. *Life Sciences*, v.58, n.18, p.1597-1590, 1996.
29. **Marinez, T. L. R.; Lourenço, D. M.** *Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico*. Câmara Brasileira do Livro, São Paulo, p.1-164, 1996.
30. **Mccormick, D. B.; Grrene, H. L.** Vitamins (ascorbic acid) In: **Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.** *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. W. B. Saunders Philadelphia, P.A. USA, p:1311-1316, 1994.
31. **Melo Filho, M.** *Sistema nervoso e imunológico na resposta ao estresse*. Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/cursos/links.html>. Acessado 25/02/2002.
32. **Michelon, E.; Moriguchi, E.** *Rev. Bras. Med.* v.56, p.117-129, 1999.
33. **Nahas, M. H.** *Atividade física, saúde e qualidade de vida*. Ed. Midiograf, Londrina-PR, p.177-196, 2001.
34. **Newman, W. P.; Fredman, D. S.; Voors, C. et al.** Relation of serum lipoprotein level and systolic blood pressure to early atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* v.314, p.138, 1986.
35. **Paiva, A. M. A.** *Stress, comportamento do tipo A e modelo bioquímico na aterosclerose coronariana*. *Ars. Cur. Cardiol.* v.34, n.32, 36, 1983.
36. **Paolini, M.; Biagi, G. L.; Forti, G. C.; Bauer, C.** Plasma ascorbic acid in heart disease. *The Lancet*, v.358, n. 9275, p.71-72, 2001.
37. **Pearson, T. A.; Crique, M. H.; Lueque, R. V. et al.** *Compêndio de cardiologia preventiva*. Ed. de Publicações Científicas, São Paulo, SP, 1997.
38. **Perkins, J. M.** *Viver sem estresse*, ed. Gente, São Paulo- SP, 104p, 1995
39. **Price, K. D.; Price, C. S. C.; Reynolds, R. D.** Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.158, p.1-12, 2001.
40. **Rogers, W.** Contemporary management of acute myocardial infarction. *The American J. Med.* v.99, n.2, p.195-206, 1995.
41. **Rossi, L.; Branca, F.; Migliaccio, S.; Paoletti, F.** Mechanical properties of bone in rats with dietary zinc deficiency. *Rivista di Scienza dell'alimentazione*, v.28, Suppl. 3, p.21-24, 1999.
42. **Roy, M.; Kirschbaum, C.; Steptoe, A.** Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinol.* p.375-391, 2001.
43. **Rozanski, A.; Blumenthal J. A.; Kaplan, J.** Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, v.99, p.2192-2217, 1999.
44. **Seley, H.** *Stress without distresse*. The New American Library Inc, New York, 1974.
45. **Shivakumar, K.; Kumar, B.** Magnesium deficiency enhances oxidative stress and collagen synthesis in vivo in the aorta of rats.the international . *J. Biochem & Cell Biol.* v.29, n.11, p.1273-1278, 1997.
46. **Silva, E. L.; Martinello, F.; Scharf, E.; Luca, D. L.; Amorin, G.; Corradi, L.; Martins, T. M.** Avaliação da interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias. *Rev. Bras. Anal. Clínicas*, v. 32, n.1, p.15-20, 2000.
47. **Simon, J. A.; Hudes, E.** Serum ascorbic acid and cardiovascular disease prevalence in U.S. adults: the third national health and nutrition examination survey (NHANES III). *Ann. Epidemiol.* v.9, p.358-365, 1999.
48. **Simon, R. M. M.** *Estresse: esclarecendo suas dúvidas*. Editora Agora, p.31-32, São Paulo, SP, 2000.
49. **Statland, B. E.** Nutrition and cancer. *Clin. Chem.* v.38, n.8, p.1587, 1992.
50. **Trenney, L.; Mcphee, S.; Papadakis, M.** *Current medical diagnosis e treatment*. 40th ed. New York: McGraw Hill Companies, p.2001.
51. **Tsopanakis, C.; Tsopanakis, A.** Stress hormonal factors, fatigue and antioxidant responses to prolonged speed driving. *Pharmacol. Biochem. Behaviour*, v.60, n.3, p.747-751, 1998.
52. **Valkonen, M.; Kuusi, T.** Vitamin C prevents the acute atherogenic effects of passive smoking. *Free Radical Biol. Med.* v.28, n.3, p.428-436.
53. **Vitor, W. R.; Dougherty, L. M.; Bernardo, N. L.** Mental stress and a cardiovascular system part VI. Chronic mental stress and cardiovascular disease: psychosocial factors. *Med. Udtate Psychiat.* v.6, p.82-85, 1998.

Endereço para correspondência

Dr^o Geny Aparecida Cantos

Rua Maestro Aldo Kringer, 138/106

88307-500 - Córrego Grande - Florianópolis, SC

Tel.: (0xx48)331-9712 - Fax: (0xx48)331-9542

E-mail: geny@ccs.ufsc.br

O que você está achando da RBAC?

Queremos saber a sua opinião sobre a nossa revista, pois só assim poderemos aprimorá-la.

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

geral@sbac.org.br

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

Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário*

Prevalence and antimicrobial susceptibility in urinary tract pathogens

R. C. V. Santos; A. Lunardelli; T. A. Castaman; F. B. Nunes; M. G. S. Pires; J. R. Oliveira & P. H. Wachter

RESUMO – Infecções bacterianas do trato urinário são um problema muito comum tanto em infecções nosocomiais quanto na comunidade. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de patógenos responsáveis por infecções no trato urinário, relacionando-os com a sua susceptibilidade frente aos antimicrobianos utilizados. Durante o período de janeiro de 1998 a dezembro de 2001 foram analisados resultados de 2378 culturas de urinas positivas de pacientes ambulatoriais, sem restrições de sexo e idade, de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Escherichia coli* foi o microrganismo isolado mais prevalente: 74,3%, seguido de *Proteus mirabilis* com 8,0% e *Enterobacter aerogenes* com 4,88%. Nitrofurantoína (NIT) apresentou altos índices de atividade frente aos Cocos Gram-positivos, enquanto que o Norfloxacin foi o antimicrobiano que apresentou a maior atividade frente aos Bacilos Gram-negativos.

PALAVRAS-CHAVE – Antimicrobianos, bactérias, infecção, trato urinário.

SUMMARY – Bacterial infections of the urinary tract is a common problem in nosocomial and community infections. The aim of this study was to determine the prevalence of responsible organism for infections in the urinary tract, relating them with its susceptibility front to used antibiotics. During the period of 1998 january to 2001 december it was analyzed the results of 2378 urine positive cultures from outpatients, without restrictions of sex and age, in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Escherichia coli* was the more prevalent isolated microorganism: 74.3%, followed by the *Proteus mirabilis* with 8.0% and *Enterobacter aerogenes* with 4.8%. Nitrofurantoin (NIT) presented high activity front Gram-positive Cocci, while the Norfloxacin, the antibiotic who presented the biggest activity front the Gram-negative Bacilli.

KEYWORDS – Antibiotic, bacteria, infection, urinary tract.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITUs) são doenças muito freqüentemente encontradas na população e são responsáveis por mais de 100.000 baixas nos hospitais nos Estados Unidos¹. Estima-se que 20 a 30% das mulheres tenham ITU pelo menos uma vez ao longo de suas vidas e que aproximadamente 5% destas irão desenvolver bacteremia².

A etiologia das ITUs e a susceptibilidade dos patógenos urinários tanto na comunidade como em infecções nosocomiais vêm se alterando de acordo com o local do estudo e com o passar dos anos³. O freqüente uso de agentes antimicrobianos podem resultar na seleção de cepas resistentes causando falhas terapêuticas importantes⁴. A resistência bacteriana vem se tornando um dos mais graves problemas, devido ao uso de antibióticos em rações animais, prescrição inadequada de antibióticos e fracas estratégias de controle de infecção entre outras⁵.

As infecções no trato urinário ocorrem mais freqüentemente em mulheres pacientes de ambulatório e de onde a terapia empírica antimicrobiana é recomendada¹. Em 1999, o *Infectious Disease Society of America (IDSA)* publicou uma recomendação para o uso de Sulfametoxazol Trimetoprima como um tratamento empírico para infecções no trato urinário, mas apenas em regiões onde o perfil de resistência dos microrganismos frente a esta droga, não ultrapasse 10 – 20%¹. Por isto, a obtenção de informações locais sobre a sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos utilizados é de grande importância para uma melhor monitorização e otimização do tratamento.

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de patógenos responsáveis por infecções no trato urinário, relacionando-os com a sua susceptibilidade frente aos antimicrobianos comumente utilizados na prática médica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o período de janeiro de 1998 a dezembro de 2001 foram analisados resultados de 2378 culturas de urinas positivas de pacientes ambulatoriais, sem restrições de sexo e idade, de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

As amostras de urina foram coletadas em frascos estéreis e levadas imediatamente ao laboratório. Foram inoculadas em ágar sangue de carneiro (Laborclin Ltda.) e ágar Mc Conkey (Laborclin Ltda.) e foram incubadas durante 24-48 horas. Foram consideradas culturas positivas, aquelas cujo crescimento em cultura foi superior a 100.000 UFC/mL. A identificação das enterobactérias foi realizado através de provas bioquímicas padronizadas (Laborclin Ltda.). A coagulase em tubo foi o teste realizado para a identificação do *Staphylococcus aureus* e o teste de resistência ao disco de novobiocina foi utilizado para a identificação do *Staphylococcus saprophyticus*. O crescimento em meio de SF foi utilizado para identificar o *Enterococcus faecalis* e o teste da oxidase em tiras foi utilizado para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios recomendados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*⁶.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton⁶ (Laborclin Ltda.), e foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: Ampicilina (AMP), Cefalotina (CFL), Amicacina (AMC), Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), Penicilina (PEN), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacin (NOR) e Oxacilina (OXA) (Laborclin Ltda.). Os halos de inibição foram medidos e os resultados foram interpretados de acordo com os critérios recomendados pelo NCCLS⁶.

Recebido em 28/8/2002
Aprovado em 6/11/2002

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

TABELA I
Prevalência de bactérias em infecções urinárias

Agente	Percentual (%)
<i>Escherichia coli</i>	74,31
<i>Proteus mirabilis</i>	8,03
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,88
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,95
<i>Staphylococcus sp.</i> (coagulase negativa)	2,40
<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	2,06
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,84
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,63
<i>Citrobacter freundii</i>	0,13
<i>Serratia marcescens</i>	0,04
<i>Streptococcus sp.</i> (grupo viridans)	0,04

RESULTADOS

Escherichia coli foi o microrganismo isolado mais prevalente: 74,3%, seguido de *Proteus mirabilis* com 8,0% e *Enterobacter aerogenes* com 4,88%, como pode ser observado na Tabela I.

A Figura 1 mostra o percentual de Cocos Gram-positivos sensíveis frente aos antimicrobianos utilizados rotineiramente. O *Staphylococcus saprophyticus* apresentou 25,6% de organismos sensíveis frente à Amicacina (AMC), 84,6% contra Penicilina (PEN), 92,3% frente à Oxacilina e 94,8% contra Nitrofurantóina (NIT) e Norfloxacin (NOR). O *Staphylococcus sp.* apresentou 24,5% de organismos sensíveis frente à Amicacina (AMC), 61,4% contra Penicilina (PEN), 80,7% frente à Oxacilina, 98,2% contra Nitrofurantóina (NIT) e 92,9% frente ao Norfloxacin (NOR). O *Streptococcus agalactiae* apresentou 8,16% de organismos sensíveis frente à Amicacina (AMC), 95,9% contra Penicilina (PEN), 24,4% frente à Oxacilina, 93,8% contra Nitrofurantóina (NIT) e 87,7% frente ao Norfloxacin (NOR). O *Enterococcus faecalis* apresentou 4,2% de organismos sensíveis frente à Amicacina (AMC), 91,4% contra Penicilina (PEN), 2,1% frente à Oxacilina, 96,8% contra Nitrofurantóina (NIT) e 87,2% frente ao Norfloxacin (NOR).

A Figura 2 representa o percentual de Bacilos Gram-negativos sensíveis frente aos antimicrobianos utilizados. A *Escherichia coli* apresentou 99,2% de organismos sensíveis ao Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), 78,8% frente à Cefalotina (CFL), 93,3% frente à Nitrofurantóina (NIT), 96,3% frente ao Norfloxacin (NOR) e 51,0% frente à Ampicilina (AMP). O *Proteus mirabilis* apresentou 76,9% de organismos sensíveis ao Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), 90,5% frente à Cefalotina (CFL), 18,3% frente à Nitrofurantóina (NIT), 100% frente ao Norfloxacin (NOR) e 64,9% frente à Ampicilina (AMP). O *Enterobacter aerogenes* apresentou 64,6% de organismos sensíveis ao Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), 62,9% frente à Cefalotina (CFL), 71,5% frente à Nitrofurantóina (NIT), 87,9% frente ao Norfloxacin (NOR) e 17,2% frente à Ampicilina (AMP). A *Klebsiella pneumoniae* apresentou 80,0% de organismos sensíveis ao Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), 88,0% frente à Cefalotina (CFL), 76,0% frente à Nitrofurantóina (NIT), 100% frente ao Norfloxacin (NOR) e 8,0% frente à Ampicilina (AMP).

DISCUSSÃO

A comparação de resultados é de difícil execução, em função da ausência de uma uniformidade de técnicas e métodos, tanto na identificação quanto nos testes de sensibilidade frente aos antimicrobianos. A prevalência e o perfil de resistência podem variar bastante, de acordo com a localidade, idade dos pacientes, uso prévio de antibioticoterapia e recente hospitalização^{7,8,9}.

Bacilos Gram-negativos e *Staphylococcus saprophyticus* foram os patógenos predominantes causadores de infecções no trato urinário em pacientes de ambulatório em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

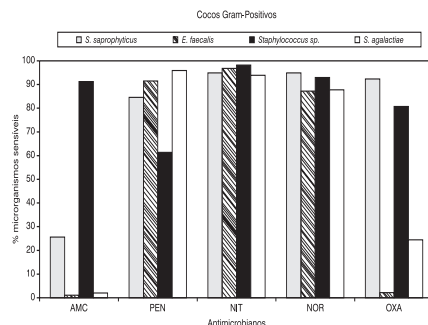


FIG. 1 - Sensibilidade de diferentes microrganismos frente à Amicacina (AMC), Penicilina (PEN), Nitrofurantóina (NIT), Norfloxacin (NOR) e Oxacilina (OXA).

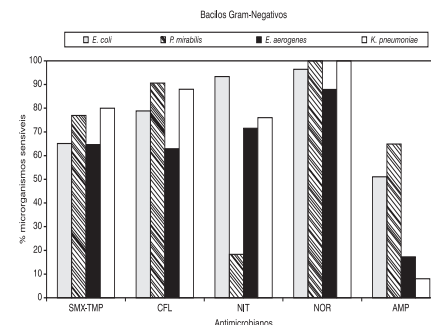


FIG. 2 - Sensibilidade de diferentes microrganismos frente ao Sulfametoxazol Trimetoprim (SMX-TMP), Cefalotina (CFL), Nitrofurantóina (NIT), Norfloxacin (NOR) e Ampicilina (AMP).

Os dados encontrados em nossos estudos referentes a prevalência, são similares aos dados encontrados por outros pesquisadores^{11,12,13,14}. Na França, De Mouy *et al.* (1986/1994)¹¹ encontraram frequências que variaram de 75 a 76% de infecções urinárias causadas por *E. coli*. Em 1995, novamente De Mouy *et al.*¹² encontraram valores de 70% para *E. coli*. Em Israel, Weber *et al.* (1991)¹³ encontraram 70% de positividade para *E. coli*. Nos Estados Unidos, Dyer *et al.* encontraram índices que variaram de 69 a 80%.

Estudos como este, são muito importantes, pois o conhecimento dos mais comuns organismos causadores de infecções no trato urinário e sua sensibilidade frente aos antimicrobianos, são importantes ferramentas como indicadores de eficácia da terapia empírica a na otimização e/ou uso racional dos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- Warren, J. W.; Abrutyn, E.; Hebel, J. R.; Johnson, J. R.; Schaeffer, A. J.; Stamm, W. E. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin. Infect. Dis.* 29:745-58, 1999.
- Kunin, C. M. Urinary tract infections in females. *Clin. Infect. Dis.* 18:1-12, 1994.
- Karlowsky, J. A.; Jones, M. E.; Thornsberry, C.; Critchley, I.; Kelly, L. J.; Sahm, D. F. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 18:121-127, 2001.
- Goldraich, N. P.; Manfro, A. Febrile urinary tract infection: *Escherichia coli* susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatr. Nephrol.* 17:173-176, 2002.
- Chomar, M. Resistance of bacteria in urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16:483-487, 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2000.
- Aguar, J. M.; Chacon, J.; Canton, R.; Baquero, F. The emergence of highly fluoroquinolone-resistant *E. coli* in community-acquired urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:349-50, 1992.
- Sader, H. S.; Jones, R. N.; Winokur, P. L.; Pfaller, M. A.; Doern, G. V.; Barrett, T. Antimicrobial susceptibility of bacteria causing urinary tract infections in latin american hospitals: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997. *Clin. Microbiol. Infect.* 5:478-87, 1999.
- Echols, R. M.; Tosiello, R. L.; Haverstock, D. C.; Tice, A. D. Demographic, clinical and treatment parameters influencing the outcomes of acute cystitis. *Clin. Infect. Dis.* 29:113-9, 1999.
- Sader, H. S.; Sampaio, J. L. M.; Zoccoli, C.; Jones, R. N. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian Medical Centers. *B. J. I. D.* 3:63-79, 1999.
- Weber, G.; Riesenberger, K.; Schlaeffer, F.; Peled, N.; Borer, A.; Yagupsky, P. Changing trends in frequency and antimicrobial resistance of urinary pathogens in outpatient clinics and a hospital in southern Israel, 1991-1995. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16:834-8, 1997.
- De Mouy, D.; Cavallo, J. D.; Fabre, R.; Garrabe, E.; Grobost, F.; Armen-gaud, M. *et al.* Les entérobactéries isolées d'infections urinaires en pratique de ville: étude. AFORCOPIBIO. *Méd. Mal. Infect.* 27:642-5, 1995.
- De Mouy, D.; Lepargneur, J. P.; Auriol, J. C.; Bandler, H.; Larribert, G.; Declercq, G. *et al.* Evolution des fréquences d'isolement et de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées d'infections urinaires en pratique de ville de 1986 à 1993. *Med. Mal. Infect.* 24:539-42, 1994.
- Dyer, I. E.; Sankary, T. M.; Dawson, J. A. Antibiotic resistance in bacterial urinary tract infections, 1991-1997. *West. J. Med.* 169:265-8, 1998.

Endereço para correspondência

Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Laboratório de Pesquisa em Biofísica - FABIO - PUCRS

Av. Ipiranga, 6681 - 90619-900 - Porto Alegre, RS

Tel. (0xx51)3320-3500 r. 4147 - Fax (0xx51)3320-3612

E-mails: rchrist@portoweb.com.br

rchrist@tutopia.com.br

Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de *Papillomavirus* humano (HPV) previamente detectado por PCR

The application and its importance in non-classic morphologic approaches to cytopathology diagnostic of Human *Papillomavirus* (HPV) previously detected for PCR

Edilson Nobuyoshi Kaneshima¹; Linda Emiko Suzuki²; Mary Mayumi Taguti Irie³; Celina Shizue Yoshida⁴; Sônia Francieli Maia da Silva⁵ & Márcia Edilaine Lopes Consolaro²

RESUMO – Existe atualmente grande preocupação com a melhoria no diagnóstico citopatológico para HPV e para isto tem-se estudado a introdução de critérios morfológicos não-clássicos, tendo em vista a elevada frequência desta infecção viral bem como o seu potencial carcinogênico. Desta forma, este trabalho objetivou uma releitura de 41 casos positivos para HPV por PCR, cujos critérios inicialmente utilizados foram apenas os clássicos, e introduzir os critérios não clássicos. Os critérios citopatológicos mais observados foram os não clássicos, sendo bi ou multinuclear o mais frequente, com n=37 (90,24%), seguido de núcleo hiper cromático, com n=35 (85,36%) e núcleo em borrão, com n=24 (58,54%). Quanto aos critérios clássicos, a disqueratose foi observada em n=17 casos (41,46%) e a coilocitose n=10 (24,35%), representando o 4º e o 9º critérios em ordem numérica de observação. Foi evidenciado também que quanto mais avançada a lesão diagnosticada pela citopatologia, menor a frequência de critérios clássicos e maior a de não clássicos. Após a inclusão dos critérios não clássicos, o diagnóstico de HPV elevou-se de 24,39% dos casos para 75,61%, sendo que 40,0% dos ASCUS e 100,0% dos NIC I, NIC II, NIC III e cânceres cervicais passaram a ser positivos para o vírus. Este é um fato de suma importância no aprimoramento dos serviços citopatológicos de rastreamento do câncer cervical. Porém, o único caso normal, os dois inflamatórios, os 4 de metaplasia escamosa e três dos 5 casos de ASCUS permaneceram negativos para HPV, representando exames citopatológicos falso negativos. Isto fato é bastante preocupante, uma vez que pacientes portadoras deste vírus, independente do estado clínico, possuem maior probabilidade de desenvolver lesões precursoras e até mesmo cânceres cervicais.

PALAVRAS-CHAVE – HPV, PCR, critérios não clássicos.

SUMMARY – Exists great concern now with the improvement in the cytopathology diagnosis for HPV and as well as been studying the introduction of morfologic approaches non-classic, tends in view the high frequency of this infection viral as well as its potential carcinogenic. This way, this work objectified the new reading of 41 positive cases for HPV for PCR, whose approaches initially used they were just the classic, and to introduce the non classic approaches. The cytopathology approaches observed were the not classic, being two or many nucleus the most frequent, with n=37 (90.24%), followed by nucleus hyperchromatic, with n=35 (85.36%) and nucleus in blot, with n=24 (58.54%). With relationship to the classic approaches, the dyskeratosis was observed in n=17 cases (41.46%) and koilocytosis n=10 (24.35%), representing the fourth and the ninth approaches in numeric order of the observation. It was also evidenced that the more advanced the lesion diagnosed by the citopatology, smaller the classic and larger frequency of approaches not classic. After inclusion of the non classic approaches, the diagnosis of HPV rose of 24.39% of the cases for 75.61% and 40.00% of ASCUS and 100.00% of NIC I, NIC II, NIC III and cervical cancers became positive for the virus. This is a fact of highest importance in the perfect of the services cytopathology to trace of the cervical cancers. Even so, the only case norm to the cytology, the 2 inflammatory, the 4 of scamous metaplasia and 3 of the 5 cases of ASCUS stayed negative for HPV, representing exams false -negative. That is quite preoccupying, once patient partadoras of the virus, independent of the clinical state, they possess larger probability of developing precursory lesions and even cervical cancers.

KEYWORDS – HPV, PCR, approaches not classics.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a associação do *Papillomavirus* Humano (HPV) e outros agentes de infecções cérvico-vaginais com a carcinogênese cervical têm sido exaustivamente estudada. Atualmente este vírus é reconhecido como o agente causal inequívoco de condilomas, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas cervicais,

entre outras lesões genitais^{5,7,34}. O ácido desoxirribonucléico (DNA) específico do HPV pode ser detectado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 90 a 95 % dos carcinomas cervicais^{11,12}. Tal fato é agravado quando leva-se em consideração que as infecções anogenitais causadas por HPV são consideradas como uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e que se apresenta em significativo estado emergente⁵.

Recebido em 8/1/2003

Aprovado em 14/2/2003

*Prêmio UFRJ em Citologia - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

¹Docente de Patologia Geral do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR;

²Docentes de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR;

³Bioquímica do Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR;

⁴Bióloga do Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR;

⁵Acadêmica do curso de Farmácia - Habilitação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.

Atualmente reconhecem-se mais de 70 genótipos de HPV com base na homologia do seu DNA, sendo que aproximadamente 30 possuem tropismo pelo trato anogenital^{26,32}. Os HPVs genitais podem infectar o epitélio escamoso e as membranas mucosas da cérvice, da vagina, da vulva, do pênis e da região perianal, e podem induzir ao aparecimento de verrugas genitais (condiloma acuminado), lesões pré-cancerosas ou cancerosas¹⁴. Os genótipos de HPV 6 e 11, principalmente, induzem a condilomas exofíticos que afetam a pele anogenital e a parte inferior da vagina, sendo detectados nas lesões intraepiteliais de baixo grau e são ditos de baixo risco. Os genótipos 16, 18, 30, 31, 33, 34 e 45 são fortemente associados com a neoplasia intraepitelial, sendo considerados de alto risco e prevalecem em cânceres anogenitais. Além destes, mais de 20 genótipos de HPV estão associados ao câncer cervical, porém o mais freqüentemente encontrado em carcinomas cervicais e em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em todo o mundo é o genótipo 16¹¹. O genótipo 18 parece predominar em adenocarcinomas e carcinomas adenocarcinosos, os quais são responsáveis por aproximadamente 5% dos cânceres cervicais¹².

As lesões oriundas de infecção pelo HPV provocam, geralmente, alterações morfológicas características, detectáveis em citologia de raspados cérvico-vaginais e biópsias. Com isso, é de suma importância a realização dos exames rotineiros de detecção precoce de câncer, através de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou²⁵. O exame citopatológico periódico para prevenção do câncer de colo uterino tem sido a melhor estratégia de Saúde Pública para a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, sendo desta forma muito útil na identificação de alterações citomorfológicas nucleares e citoplasmáticas relacionadas ao HPV⁴⁷.

Historicamente, estas alterações morfológicas para diagnóstico de HPV em citopatologia já haviam sido descritas por Papanicolaou em 1933³³, embora esse autor não reconhecesse nelas a causa de sua expressão. Já em 1956, Koss & Durfee descreveram células com a expressão citopática, utilizando pela primeira vez o termo coilocitose para os halos característicos presentes nas lesões. Em 1960, Ayre aventou pela primeira vez a etiologia viral para a coilocitose, sendo o termo utilizado até hoje.

Atualmente existe grande preocupação em torno da melhoria do diagnóstico citopatológico, pois em países em desenvolvimento a triagem citológica vem falhando em promover a redução na incidência de câncer cervical, sendo uma das causas a limitação de sensibilidade do método^{20,48}. Com isto, têm-se estudado a introdução de novos critérios morfológicos, denominados não clássicos ou secundários para o diagnóstico citológico de HPV em adição aos critérios morfológicos ditos clássicos, ou seja, coilocitose e disqueratose. O intuito disto é ampliar a sensibilidade do método, aproximando-a da obtida em amostras histopatológicas e nos métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, tais como a detecção do DNA viral por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)^{8,25}.

Dada a importância da citologia oncológica no rastreamento populacional de HPV, a maximização da eficiência morfológica é fundamental para atender às expectativas dos controles periódicos para a prevenção e detecção do HPV, dos cânceres de colo uterino e suas lesões precursoras. Desta forma, o presente trabalho objetivou uma reanálise de esfregaços cérvico-vaginais de pacientes com diagnóstico positivo para HPV por PCR, cujos critérios citopatológicos utilizados inicialmente para este vírus foram apenas os clássicos, e introduzir os critérios não clássicos, com o intuito de verificar a importância da aplicação dos mesmos na eficiência diagnóstica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras coletadas de pacientes do município de Maringá- Brasil e região por técnica padrão VCE (Vaginal-Cervical-Endocervical) para a confecção dos esfregaços para citopatologia⁵, sendo que parte do material endocervical foi estocado em tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM pH 8.5; EDTA 1 mM) e congelado a -20°C para posterior extração do DNA e análise pela técnica de PCR³, modificada para um volume final de 25 ml, onde foram utilizados os iniciadores consenso MY09/MY11 (CGTCCMAARGGAWACTGATC/GCMCAGGGWCATAAYAATGG), que amplificam especificamente uma parte do gene L1 que é a região mais conservada na seqüência de DNA entre os diferentes tipos de HPV. Para cada reação de amplificação utilizou-se 5µL da solução do DNA extraído anteriormente; 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,5mM de MgCl₂; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 12,5 pmoles de cada iniciador e 0,75U de Taq DNA polimerase para um volume final de 25µL. As reações de amplificação foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL que foram transferidos para o termociclador (MJ Research PTC 150). O programa de PCR consistiu das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 min.; 55°C por 1 min.; 72°C por 1 min.) e 72°C por 5 minutos para a extensão final da reação de amplificação. Foram consideradas positivas para o DNA de HPV as amostras em que houve a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 450 pares de base.

Uma vez detectado o DNA de HPV, os esfregaços foram corados e lidos em microscópio óptico em objetivas de 10X, 20X e 40X, através da técnica de Papanicolaou⁴⁵. Foram realizadas duas leituras, sendo que a 1ª leitura levou em consideração apenas os critérios citomorfológicos clássicos para diagnóstico de HPV, ou seja, coilocitose e disqueratose^{19,22,28,36,38}. A 2ª leitura considerou além dos critérios clássicos, 14 critérios não clássicos, sendo eles: células em fibra, células gigantes, células parabasais coilocitóticas, bi ou multinucleação, coilocitose leve, condensação em filamentos, cariorrexe, disqueratose leve, escamas anucleadas, grânulos querato-hialinos, halo perinuclear, núcleo em borrão, núcleo em fibra, núcleo hiperromático^{9,16, 27,28,29,30,32,38,41}.

Foram considerados como positivos para HPV na 2ª leitura os casos que apresentaram: 1 critério clássico associado a 4 ou mais não clássicos; 2 critérios clássicos associados ou não a critérios não clássicos e aqueles com 4 ou mais critérios não clássicos^{7,8,18,25,47}.

RESULTADOS

Os resultados da primeira leitura da citologia oncológica dos 41 casos positivos para HPV por PCR demonstraram predominância de NIC I sem alterações morfológicas características de HPV, com n=11 (26,83%), seguido de NIC I com alterações morfológicas de HPV, n=10 (24,39%) e assim sucessivamente, conforme Tabela I.

A freqüência de observação de critérios citomorfológicos de HPV na 2ª leitura, após a inclusão dos critérios não clássicos, é representada na Tabela II.

O caso normal pela citologia não demonstrou critérios clássicos ou não-clássicos. Em apenas 10 dos 21 casos de NIC I foi observado o critério clássico coilocitose. Os casos de ASCUS, NIC II e câncer cervical, quando apresentaram critério clássico, o mesmo tratava-se de disqueratose.

Dos dois casos inflamatórios, apenas um demonstrou critérios para HPV, tendo sido observado bi ou multinucleação, com n=1 (50,00%) e núcleo hiperromático, tam-

TABELA I
Resultado da primeira leitura
da citologia oncótica cérvico vaginal
dos 41 casos positivos para HPV por PCR

Citologia oncótica cérvico vaginal	nº	%
Normal	01	2,44
Inflamatório	02	4,88
Metaplasia escamosa	04	9,76
ASCUS	05	12,19
NIC I com HPV	10	24,39
NIC I sem HPV	11	26,83
NIC II	05	12,19
NIC III	01	2,44
Carcinoma epidermóide	02	4,88
Total	41	100,00

ASCUS - Atipias em células escamosas de significado indeterminado
 NIC I - Neoplasia intraepitelial cervical grau I
 NIC II - Neoplasia intraepitelial cervical grau II
 NIC III - Neoplasia intraepitelial cervical grau III
 Carcinoma epidermóide - Carcinoma cervical do tipo epidermóide

TABELA III
Critérios citomorfológicos de HPV
nos casos de ASCUS, NIC I e NIC II

Critérios	ASCUS		NIC I		NIC II	
	nº	%	nº	%	nº	%
Coilocitose	-	-	10	47,62	01	20,00
Disqueratose	01	20,00	13	61,90	01	20,00
Células em fibra	-	-	10	47,62	04	80,00
Células gigantes	01	20,00	14	66,67	02	40,00
Células parabasais coilocitóticas	-	-	-	-	01	20,00
Bi ou multinucleação	05	100,00	21	100,00	05	100,00
Coilocitose leve	-	-	04	19,05	01	20,00
Condensação em filamentos	01	20,00	14	66,67	01	20,00
Cariorrexe	-	-	03	14,28	01	20,00
Disqueratose leve	03	60,00	07	33,33	03	60,00
Escamas anucleadas	-	-	01	4,76	03	60,00
Grânulos querato-hialinos	-	-	04	19,05	01	20,00
Halo perinuclear	-	-	09	42,86	04	80,00
Núcleo em borrão	01	20,00	15	71,43	05	100,00
Núcleo em fibra	-	-	07	33,33	03	60,00
Núcleo hiper cromático	04	80,00	20	95,24	05	100,00
Total de casos	05	-	21	-	05	-

bém com n=1 (50,00). Nos 4 casos de metaplasia escamosa, foi observado: bi ou multinucleação e disqueratose, ambos com n=2 (50,00%), cariorrexe, com n=1 (25,00%) e núcleo hiper cromático, com n=4 (100,00). Desta forma, para os casos inflamatórios e os de metaplasia escamosa, 100% dos critérios observados foram não clássicos (Tabela IV) e não foram suficientes para sugerir HPV pela citologia oncótica após a 2ª leitura, ou seja, permaneceram morfológicamente negativos para o vírus (Tabela V).

Nos 5 casos de ASCUS, predominaram os seguintes critérios: bi ou multinucleação, com n=05 (100,00%), núcleo hiper cromático, com n=04 (80,00%) e disqueratose leve, com n=03 (60,00%), (Tabela III). Desta forma, dos 7 diferentes critérios observados, 1 foi clássico (14,28%) e 6 foram não clássicos (85,71%) (Tabela IV). Os 02 casos demonstraram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia após a 2ª leitura, o que representa 4,88% do total de casos estudados, sendo que na 1ª leitura os 5 casos de ASCUS foram considerados negativos para o vírus (Tabela V).

TABELA II
Frequência de observação de critérios citomorfológicos
após a 2ª leitura, com a utilização dos critérios
não clássicos

Critérios morfológicos	Casos (nº)	Frequência de casos (%)
Bi ou multinucleação	37	90,24
Núcleo hiper cromático	35	85,36
Núcleo em borrão	24	58,54
Células gigantes	18	43,90
Disqueratose	17	41,46
Células em fibra	17	41,46
Condensação em filamentos	16	39,02
Disqueratose leve	15	36,58
Halo perinuclear	15	36,58
Núcleo em fibra	13	31,71
Coilocitose	10	24,39
Coilocitose leve	05	12,19
Grânulos querato-hialinos	05	12,19
Cariorrexe	05	12,19
Células parabasais coilocitóticas	01	2,44
Escamas anucleadas	01	2,44

TABELA IV
Frequência de critérios morfológicos clássicos
e não clássicos de HPV para os diferentes
aspectos citopatológicos

Aspectos citopatológicos	Critérios de HPV	
	Clássicos (%)	Não clássicos (%)
Inflamação	-	100,00
Metaplasia escamosa	-	100,00
ASCUS	14,28	85,71
NIC I	13,33	86,67
NIC II	6,67	93,33
NIC III	-	100,00
Câncer cervical	12,5	87,50

TABELA V
Número e frequência de casos
com morfologia positiva na 1ª e na 2ª leitura

Aspectos citopatológicos	Casos em estudo	Casos positivos para HPV			
		Critérios clássicos		Critérios clássicos e não clássicos	
		(1ª leitura)		(2ª leitura)	
	nº	%	nº	%	
Normal	01	-	-	-	-
Inflamação	02	-	-	-	-
Metaplasia	04	-	-	-	-
ASCUS	05	-	-	02	4,88
NIC I	21	10	24,39	21	51,22
NIC II	05	-	-	05	12,19
NIC III	01	-	-	01	2,44
Câncer cervical	02	-	-	02	4,88
Total	41	10	24,39	31	75,61

Para os 21 casos de NIC I, os critérios predominantes foram: bi ou multinucleação, com n=21 (100,0%), núcleo hiper cromático, com n= 20 (95,24%), núcleo em borrão, com n=15 (71,43%), células gigantes e condensação em filamentos, ambos com n=14 (66,66%), e disqueratose, com n=13 (61,90%), (Tabela III). Dos 15 diferentes critérios observados, 2 foram clássicos (13,33%) e 13 não clássicos (86,67%) (Tabela IV). Os 21 casos demonstraram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV através da citopatologia após a 2ª leitura, o que representa 51,22% do total de casos em estudo, sendo que na primeira leitura apenas 10 casos de NIC I foram considerados citologicamente positivos para o vírus (Tabela V).

Nos 5 casos de NIC II, houve predominância dos seguintes critérios: bi ou multinucleação, núcleo em borrão e núcleo hiper cromático, todos com n=05 (100,00%), seguidos de células em fibra e halo perinuclear, ambos com n=04 (80,00%) , e disqueratose leve e escamas anucleadas, ambos com n=03 (60,00%) (Tabela III). Dos 15 diferentes critérios observados, 1 foi clássico (6,67%) e 14 não clássicos (93,33%) (Tabela IV). Estes 05 casos apresentaram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 12,19% do total de casos, sendo que na 1ª leitura estes 05 casos foram considerados citologicamente negativos para o vírus (Tabela V).

Para o único caso de NIC III, os critérios observados foram: bi ou multinucleação, células em fibra, disqueratose, núcleo em borrão, núcleo em fibra e núcleo hiper cromático. Portanto, 100% dos critérios para HPV observados foram não clássicos (Tabela IV) e este único caso apresentou critérios morfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 2,44% do total de casos, sendo que na 1ª leitura este caso foi considerado citologicamente negativo para o vírus (Tabela V).

Nos dois casos de carcinoma epidermóide, foram observados como critérios predominantes: bi ou multinucleação, células em fibra, halo perinuclear, núcleo em borrão, núcleo em fibra e núcleo hiper cromático, todos com n=2 (100,00%), enquanto que células gigantes e disqueratose apresentaram n=1 (50,00%). Assim, dos 8 critérios observados, 1 foi clássico (12,5%) e 7 não clássicos (87,5%) (Tabela IV). Estes dois casos apresentaram critérios suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 4,88% do total de casos, sendo que na 1ª leitura estes dois casos de carcinoma foram considerados citologicamente negativos para o vírus (Tabela V).

A Tabela IV demonstra a frequência de critérios morfológicos clássicos e não clássicos para HPV nos diferentes aspectos citopatológicos analisados.

A Tabela V demonstra o número e a frequência de casos positivos para HPV em cada aspecto citopatológico analisado antes e após a utilização de critérios não clássicos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico citopatológico tem-se mostrado prático para triagem do câncer de colo uterino de grandes populações devido a sua simplicidade, reprodutibilidade, precisão e baixo custo, sendo que desde a sua implantação em Saúde Pública como método de triagem e detecção precoce de neoplasias cérvico-uterinas, a morbidade e a mortalidade decorrentes destes cânceres foram reduzidas significativamente, como pode ser comprovado em países desenvolvidos¹¹. No entanto, conforme a Tabela I,

somente 10 casos (24,39%) apresentaram alterações citopáticas características da infecção por HPV. Este fato reforça a importância do aprimoramento no diagnóstico citopatológico da infecção cervical por este vírus, principalmente devido ao potencial oncogênico que apresentam alguns genótipos de HPV e pela crescente incidência deste agente^{2,13,17,31,32,44}.

A Tabela II demonstra que o critério mais observado foi a bi ou multinucleação, com n=37, presente portanto em 90,24% dos casos, seguido de núcleo hiper cromático, com n=35 (85,36% dos casos), ambos critérios não clássicos. Collaço & Pinto⁸ apontam em seus resultados a bi ou multinucleação como o critério predominante, tendo sido visualizado em 91,00% dos casos, sendo desta forma coincidente com o presente trabalho.

Com relação à frequência dos critérios clássicos, a mesma Tabela II evidencia que a disqueratose foi o 4º critério mais frequente, com n=17, o que representa 41,46% dos casos estudados. A coilocitose representou o 9º critério em ordem de observação, com n=10 e presente portanto em 24,39% dos casos. Collaço & Pinto⁸ relatam que em seu trabalho a disqueratose foi observada em 41,30% dos casos e a coilocitose em 36,00%, sendo o primeiro coincidente com os dados do presente trabalho e o segundo superior. Apesar da literatura ser unânime em apresentar a coilocitose como critério patognomônico para o diagnóstico de HPV e que exprime a atividade viral, muitos autores destacam que este não é o critério mais frequentemente encontrado nos esfregaços^{2,4,14,20,23,39,42,50,51}. O presente estudo confirma o citado por estes autores e destaca a elevada frequência de critérios não clássicos, que são inclusive os mais comumente detectados, como demonstram as Tabelas II, III e IV.

A Tabela IV evidencia ainda que, quanto mais grave o grau da lesão cervical, maior a observação de critérios não clássicos e menor a dos clássicos. Tratando-se especificamente do critério clássico coilocitose, o mesmo somente foi observado nas lesões iniciais tipo NIC I. Em estágios mais avançados como NIC II, NIC III e câncer cervical, este critério não foi observado, ocorrendo o mesmo em alterações pré-lesionais, como inflamação, metaplasia escamosa e ASCUS. Alguns autores descrevem que, na medida em que a lesão progride, o vírus vai passando a não produzir mais a partícula viral completa e o seu genoma vai integrando-se ao genoma da célula hospedeira. Perde-se o poder infectante, ganhando-se poder oncogênico, o que implica em expressão citopática menos evidente ou inexistente^{14,37}.

A frequência diagnóstica de HPV através da citologia oncológica após a inclusão dos critérios não clássicos passou de 24,39% para 75,61%, ou seja, elevou-se em 51,22%, como mostra a Tabela V. Este fato é de suma importância no aprimoramento dos serviços citopatológicos prestados, identificando um grupo muito maior de pacientes com risco para o desenvolvimento de câncer de colo uterino. Cavalieri *et al.*⁷ descrevem que a utilização de critérios não clássicos elevou o diagnóstico de HPV em 37,50%, Carvalho & Oyakawa⁶ também descrevem que a introdução de critérios não clássicos de HPV aumentam a sensibilidade do exame citológico. Franco¹⁰ relata que com a utilização dos critérios não clássicos associados aos clássicos na leitura de esfregaços cérvico-vaginais, a detecção de HPV aumentou sensivelmente, sendo que 80,70% dos NIC I, 84,60% dos NIC II, 66,60% dos NIC III e 52,10% dos carcinomas cervicais passaram a apresentar estigmas que sugeriam associação com HPV. A mesma Tabela V deste trabalho demonstra que 40,00% dos ASCUS e 100,00% dos NIC I, NIC II, NIC III e cânceres cervicais passaram a ser positivos para o vírus após a

inclusão de critérios não clássicos, apresentando portanto uma otimização diagnóstica superior à descrita por este último autor.

Mesmo introduzindo os critérios não clássicos, a melhora no diagnóstico de HPV pela citopatologia em infecções subclínicas ou latentes não é muito representativa. No único caso normal, nos dois de inflamação, nos 4 de metaplasia escamosa e em três de ASCUS, a citologia apresentou-se falsamente negativa, pois não existem características morfológicas suficientes para a detecção do vírus, sendo que as mesmas são a base para o diagnóstico citopatológico^{15,21,26,46}. Trofatter⁴⁶ e Koutsky *et al.*²¹ descrevem que, nos casos em que não há manifestações clínicas, sinais morfológicos de HPV podem ser difíceis de detectar. A citologia possui sucesso diagnóstico principalmente nas lesões clinicamente aparentes, conforme o confirmado por Suzuki⁴³.

Este fato é bastante preocupante, uma vez que pacientes portadoras deste vírus, principalmente de alto potencial carcinogênico, independente de estar em estado clínico, subclínico ou latente, possuem maior probabilidade de desenvolver lesões precursoras e até mesmo cânceres cervicais^{24,35,40,47,49}. Segundo Jacyntho *et al.*¹⁴ as metodologias moleculares são as mais indicadas para o diagnóstico da infecção por HPV nos casos subclínicos ou latentes por detectarem o DNA viral, mesmo que em pequenas quantidades, fato este claramente demonstrado no presente trabalho. Porém, Trofatter⁴⁶ cita que o diagnóstico molecular de casos latentes ou assintomáticos tem seu valor incerto, pois a relevância clínica destes tipos de infecção não está ainda determinada.

REFERÊNCIAS

1. Ayre, J. E. Role of the halo cell in cervical carcinogenesis: a virus manifestation of premalignancy? *Obstet. Gynecol.*, 17:175-82, 1960.
2. Azocar, J.; Abad, S. M. J.; Acosta, H.; Hernandez, R.; Gallegos, M.; Pijano, E.; Blanch, R.; Kramer, A. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int. J. Cancer*, 45:622-25, 1990.
3. Bauer, H. B.; Manos, M. M. PCR Detection of genital human papillomavirus. In: Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Mayo Foundation Rochester, 1993.
4. Bibbo, M.; Moraes Filho, A. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro, Revinter, 60-64p, 1998.
5. Bonfiglio, T.; Erozan, Y. S. *Gynecology cytopathology*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. p.51-72.
6. Carvalho, J. J. L.; Oyakawa, N. *I Consenso Brasileiro de HPV*. 1ª ed. São Paulo, BG Cultural, p.49, 56, 57, 2000.
7. Cavaliere, M. C.; Longatto Filho, A.; Pereira, G. M. C.; Maeda, M. Y. S.; Loreto, C. D. Papilomavirus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union.*, 15(59-60):24, 1990.
8. Collaço, L. M.; Pinto, A. P. Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da associação de HPV com displasia e carcinoma de colo uterino. *J. Bras. Gynecol.*, 104(11/12):419-421, 1994.
9. De Borges, R. J.; Garcia Tamayo, J.; Zaitzman, M. Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration in cervical cells from patients with human Papillomavirus infections. *Acta Cytol.*, 33(3):314-318, 1989.
10. Franco, E. L. Epidemiologia do câncer mamário ginecológico. In: ABRÃO, F. S. *Tratado de oncologia genital e mamária*. São Paulo, Roca. p. 3-16, 1995.
11. Gompel, C.; Koss, L. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. 1ª ed. São Paulo, Manole, p.79-105, 1997.
12. Gross, G. E.; Barasso, R. *Infecção por Papilomavirus humano. Atlas clínico de HPV*. Porto Alegre, Artmed, p.1-18, 1999.
13. Gupta, J. W.; Gupta, P. K.; Rosenshein, N.; Shah, K. V. Detection of human Papillomavirus in cervical smears. A comparison of in situ hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol.*, 31:387-96, 1987.
14. Jacyntho, C.; Almeida Filho, G.; Maldonado, P. *HPV Infecção Genital Feminina e Masculina*. 1ª ed., Rio de Janeiro, Revinter. p.5-30, 1996.
15. Hinchliffe, S. A.; Velzen, D.; Korporeal, H.; Kok, P. L.; Boon, M. E. Transience of cervical HPV infection in sexually active, young women with normal cervicovaginal cytology. *Brit. J. Cancer*, 72:943-945, 1999.
16. Kern, S. B. Significance of anucleated squames in Papanicolaou stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol.*, 53(1), 1991.
17. Kochel, H. G.; Teichmann, A.; Eckardt, N.; Arendt, P.; Kuhn, W.; Thoomsen R. Occurrence of human Papillomavirus DNA types 16 and 18 (HPV - 16/18) in cervical smears as compared to cytological findings. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 31:145-52, 1990.
18. Korobowicz, E.; Kwasniewska, A.; Georgiades, I. The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *J. Pathol.*, 48(2):107-112, 1997.
19. Koss, L. G.; Durfee, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann. NY Acad. Sci.*, 63:1245-61, 1956.
20. Koss, L. G. The Papanicolaou test for cervical. a triumph and a tragedy. *JAMA*, 261:737-743, 1989.
21. Koutsky, L. A.; Galloway, D. A.; Holmes, K. K. Epidemiology of genital human Papillomavirus infection. *Epidemiol. Revist.*, 10:122-163, 1988.
22. Kurman, R. J.; Solomon, D. *The Bethesda System for reporting cervical vaginal cytologic diagnoses*. New York, Springer-Verlag, 1997.
23. Landrac, L. Koilocytes: valeur diagnostique. In: *Anais. 1ère. J. Vén. Mars.*, 1989. p.2.
24. Levi, J. E. HPV: Por que e quando diagnosticar. *News Lab*, 14: 66-72, 1996.
25. Loreto, C. D.; Maeda, M. Y. S.; Pereira, G. M. C.; Longatto Filho, A.; Cavaliere, M. J. Papilomavirus em saúde pública: Importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union*, 15 (59-60):24-39, 1992.
26. Lörcincz, A. T.; Reid, R. *Clínicas obstétricas e ginecológicas da América do Norte. Papilomavirus humanos*. Vols. 3 e 4. Rio de Janeiro, Interlivros. p.565- 74, 759-86, 1996.
27. Luzzatto, R.; Recktenvald, M.; Portugal, J. P. L. Multinucleation and abortive cellular division in human Papillomavirus infection. *Acta Cytol.*, 34(2):286-287, 1990.
28. Meisels, A.; Fortin, R. Condylomatous of the cervix and vagina: 1) Cytologic patterns. *Acta Cytol.*, 20:505-509, 1976.
29. Meisels, A.; Morin, C.; Casas Cordero, M.; Roy, M.; Fortier, M. Condyloma of the uterine cervix. In: *Compendium on diagnostic cytology*. Chicago, Illinois, 6ª Edition, p.63-8, 1988.
30. Naib, Z. M.; Masukawa, N. Identification of condyloma acuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet. & Gynecol.*, 18(6):735-738, 1961.
31. Nuovo, G. J.; Nuovo, M. A.; Contral, S.; Gordon, S.; Silverstein, S. J.; Crum, C. P. Histological correlates of clinically occult human Papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am. J. Surg. Pathol.*, 12:198-203, 1988.
32. Nuovo, G. J. Human papillomavirus DNA. In: genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am. J. Surg. Pathol.*, 14:643-51, 1990.
33. Papanicolaou, G. *Atlas of exfoliative cytology*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. p.18-19 (suppl. 2), 1960.
34. Pinto, A. P.; Collaço, L. M. Revisão das alterações citomorfológicas da infecção pelo vírus do papiloma humano em citologia cervicovaginal. *J. Bras. Patol.*, 37(1): 57-61, 2001.
35. Poljak, M.; Brencic, A.; Seme, K.; Vince, A.; Marin, I. J. Comparative evaluation of first second generation digene hybrid capture assays of detection of human Papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J. Clin. Microb.*, 37 (3): 796-797, 1999.
36. Purola, E.; Savia, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol.*, 21:26-31, 1977.
37. Sadoul, G.; Beuret, T. H. La place du laser dans les lésions du col. *La Revue du Practicien.*, 36:876, 1986.
38. Schneider, A.; Meinhardt, G.; De-villiers, E. M.; Gissmann, L. Sensivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.*, 3:250-3, 1987.
39. Schneider, M. L.; Schneider, V. *Citologia ginecológica*. Rio de Janeiro, Revinter. p.59-61, 1998.
40. Shih, L. W. S.; Yamamoto, L. S. U.; Maeda, M. Y. S.; Alves, V. A. F. Papilomavirus na área metropolitana de São Paulo: aspectos citológicos e imunocitoquímicos. *Acta Oncol. Bras.*, 8(2):59-64, Mai/Ago, 1988.
41. Shroyer, K. R.; Hosey, J.; Swanson, L. E.; Woodard, W. D.; Fennell, R. H. Cytologic diagnosis of human papillomavirus infection: spindled nuclei. *Diagn. Cytopathol.*, 6(3):178-183, 1990.
42. Silva Filho, A. M.; Longatto Filho, A. *Colo uterino & vagina - processos inflamatórios*. Rio de Janeiro, Revinter, 2000. p.123-145.
43. Suzuki, L. E. *Eficiência da técnica de Papanicolaou na detecção do Papilomavirus Humano*. Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública da Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Ponta Grossa, 2000.
44. Syrjänen, K.; Mantyjärvi, R.; Saarikoski, S.; Vayrynen, M.; Syrjänen, S.; Parkkinen, S.; Yliskoski, M.; Saastamoinen, J.; Castren, O. Factors associated with progression in cervical human Papillomavirus (HPV) infections into carcinoma in situ during a long-term prospective follow-up. *Brit. J. Obst. Gynaecol.*, 95:1096-1102, 1988.
45. Takahashi, M. *Atlas de citologia do câncer*. 2ª ed. São Paulo, Manole. p.74- 82, 1982.
46. Trofatter, K. F. Diagnosis of human Papillomavirus genital tract infection. *Am. J. Med.*, 5:21-27, 1997.
47. Utagawa, M. L.; Loreto, C.; Maeda, M. Y. S.; Kanamura, M. T.; Longatto Filho, A. Papilomavirus Humano em esfregaços citológicos de mulheres acima de 50 anos: estudo morfológico e de hibridização "in situ" nas respectivas biópsias. *J. Bras. Gin.*, 107(4):83-87, 1997.
48. Vince, A.; Ivanisevic, M.; Harni, V.; Skalko, D.; Jeren, T. Molecular detection of human papillomavirus in women with minor - grade cervical cytology abnormalities. *J. Clin. Vir.*, 20:91-94, 2001.
49. Yoshinouchi, M.; Hongo, A.; Nakamura, K.; Kodama, J.; Itoh, S.; Sakai, H.; Kudo, T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human Papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J. Clin. Microb.*, 37(11): 3514-3517, 1999.
50. zür Hausen, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.*, 36:530, 1976.
51. zür Hausen, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current topics. Microbiol. Immunol.*, 78:1, 1977.

Endereço para correspondência

Drª Márcia Edilaine Lopes Consolara

Av. Colombo, 5.790 - Zona 7 - 87020-900 - Maringá - PR

Tel.: (0xx44)261-4317 - Fax: (0xx44)263-6044

E-mail: melconsolara@uem.br

Diagnóstico laboratorial da tuberculose na cidade do Rio Grande, RS, Brasil*

Tuberculosis' laboratorial diagnosis in Rio Grande city, RS, Brazil

Maria Marta Santos Boffo¹; Ivo Gomes de Mattos¹; Marta Osório Ribeiro²; Suzana Jardim² & Valéria Carla de Souza¹

RESUMO – Objetivando enfatizar a importância do diagnóstico laboratorial da tuberculose, avaliou-se os resultados obtidos pela realização da baciloscopia e da cultura em 372 amostras clínicas provenientes de pacientes com suspeita clínica e/ou radiológica da doença. Destas, 150 provenientes de sítios pulmonares e 222 de extrapulmonares referentes a 264 pacientes atendidos no Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, cidade do Rio Grande, RS, Brasil, entre setembro de 1997 e julho de 2000. O diagnóstico de tuberculose foi obtido em 28/150 das amostras pulmonares e em 18/222 das extrapulmonares. Do total de amostras analisadas, a baciloscopia destas detectou BAAR em 6,7%, enquanto a cultura permitiu o isolamento de micobactérias em 10,2%. A prevalência de *Mycobacterium tuberculosis* foi de 97,4%. Os dois métodos utilizados para o diagnóstico de tuberculose mostraram um rendimento que incentiva a sua realização sistemática.

PALAVRAS-CHAVE – Tuberculose, tuberculose pulmonar, tuberculose extrapulmonar, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico laboratorial

SUMMARY – For the purpose to evaluate laboratory importance in the tuberculosis diagnosis were evaluated the results obtained by microscopic detection of acid-fast-bacilli (AFB) and culture in 372 specimens from patients with suggestive findings of tuberculosis. 150 specimens from pulmonaries sites and 222 extrapulmonaries relative to 264 patients admitted in the University Hospital of Federal University Foundation of Rio Grande, Rio Grande city, RS, Brazil, between september 1997 and july 2000. The tuberculosis diagnosis was done in 28/150 pulmonaries specimens and in 18/222 extrapulmonaries. From the total of analysed specimens, the microscopic examination showed AFB in 6.7% specimens, while the culture was positive for mycobacteria in 10.2%. The frequency of *Mycobacterium tuberculosis* was of 97.4%. The satisfactory performance of both methods used for detection of tuberculosis, allowed to indicate the systematic realization of them.

KEYWORDS – Tuberculosis, pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, laboratorial diagnosis.

INTRODUÇÃO

Na atualidade, a tuberculose é a doença infecciosa com maior índice de morbidade e mortalidade no mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, calcula-se aproximadamente 100 mil novos casos de tuberculose por ano com um número de mortes entre 4 a 5 mil, no mesmo período. Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) vem se observando um crescente aumento do número de casos notificados de tuberculose¹.

A cidade portuária de Rio Grande, com 180.000 habitantes, pertence à área regional de alta prevalência de tuberculose segundo o Programa de Controle desta enfermidade no Estado do Rio Grande do Sul (RS)², e, está entre aquelas, com maior número de casos de AIDS na região sul³.

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, a baciloscopia do escarro é o método utilizado para o diagnóstico da tuberculose. Este método,

além de permitir a identificação da fonte mais importante de infecção, o doente bacilífero, é um método simples, sensível e de baixo custo¹. Também é importante considerar a baciloscopia como o exame que nos fornece o diagnóstico precoce da infecção pelo *M. tuberculosis*. Todavia, observa-se, que embora propicie uma substancial contribuição ao diagnóstico, este método apresenta uma sensibilidade menor do que a cultura⁴, a qual é considerada o "padrão ouro" para o diagnóstico desta infecção. O método baciloscópico foi, em nosso serviço, complementado rotineiramente pela cultura, o que nos permitiu ampliar a probabilidade de diagnóstico das formas paucibacilares de tuberculose pulmonar e extrapulmonar bem como, a identificação da espécie de micobactéria.

O presente trabalho visou enfatizar a importância, em nosso meio, da realização da baciloscopia e da cultura para o diagnóstico da tuberculose, mostrando o rendimento de ambos os métodos no grupo de pacientes estudados.

Recebido em 15/10/2002

Aprovado em 18/11/2002

*Laboratório de Micobactérias - Departamento de Patologia - Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS;

¹Departamento de Patologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG;

²Laboratório Central (LACEN) - Secretaria da Saúde e Meio Ambiente, RS

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas no Laboratório de Micobactérias, do Departamento de Patologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, um total de 372 amostras clínicas, 150 provenientes de sítios pulmonares e 222 de extrapulmonares, referentes a 264 pacientes atendidos no Hospital Universitário, no período entre setembro de 1997 e julho de 2000. Os pacientes foram investigados por apresentarem manifestações clínicas e/ou radiológicas sugestivas de tuberculose, tanto na forma pulmonar como extrapulmonar, dos quais, 94 tinham somente amostras pulmonares, 140 extrapulmonares e 30 em ambas. A distribuição das amostras quanto ao sítio de obtenção está representada na Tabela I. Do grupo de pacientes estudados, 146 eram portadores de AIDS, segundo o critério do "Center for Disease Control" (CDC), EUA⁵. Os demais pacientes tinham sorologia desconhecida para o HIV.

A baciloscopia foi realizada a partir de esfregaços corados pela técnica de Kinyoun (coloração a frio)⁶ e, então, observados ao microscópio de luz transmitida com aumento de 1000 vezes, para detecção de BAAR. Os esfregaços foram examinados de modo que todos os campos microscópicos fossem visualizados.

A cultura para isolamento e identificação inicial de *M. tuberculosis* foi realizada em meio de Ogawa⁷ e Ogawa adicionado de ácido p-nitro-benzóico, de hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico e de piruvato de sódio. Os meios de cultivo, após semeadura, eram incubados a 37°C, observados diariamente nos primeiros 7 dias e, semanalmente, por um período de 4 semanas. Na ausência de crescimento por um período adicional de 4 semanas, os mesmos eram descartados. Os materiais examinados considerados contaminados (escarro, lavado broncoalveolar e urina) eram submetidos, antes da semeadura, à descontaminação pela introdução do "swab" em um tubo de ensaio contendo solução de hidróxido de sódio a 4%, durante dois minutos. A prova da produção de niacina foi utilizada para confirmação da espécie *M. tuberculosis*⁸.

TABELA I
Distribuição das amostras clínicas analisadas

Amostras pulmonares	Número de amostras
Escarro	68
Lavado broncoalveolar	82
Total	150
Amostras extrapulmonares	Número de amostras
Líquido pleural	38
Líquor	45
Líquido ascítico	17
Biópsia pleural	03
Biópsia de pele	05
Biópsia de medula óssea	03
Biópsia hepática	20
Biópsia ganglionar	55
Aspirado de medula óssea	06
Urina	20
Outros	10
Total	222

RESULTADOS

A partir do estudo de 372 amostras clínicas, 150 provenientes de sítios pulmonares e 222 de extrapulmonares, referentes a 264 pacientes, foi obtido o diagnóstico de tuberculose pulmonar em 28/150 (18,6%) das amostras e, de tuberculose extrapulmonar, em 18/222 (8,2%). As 46 amostras com diagnóstico de tuberculose eram oriundas de 45 (17%) pacientes; destes 27 (10,2%) tiveram o diagnóstico de tuberculose pulmonar, 17 (6,4%) de extrapulmonar e um (0,4%) de pulmonar e extrapulmonar.

Do total de amostras analisadas provenientes de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar e/ou extrapulmonar, a baciloscopia detectou BAAR em 25 (6,7%), enquanto a cultura permitiu o isolamento de micobactérias em 38 (10,2%).

A distribuição das amostras pulmonares e extrapulmonares positivas em pelo menos um dos procedimentos microbiológicos utilizados para a detecção de BAAR, quanto ao sítio de obtenção incluiu: 9/68 escarros, 19/82 lavados broncoalveolares, 11/55 biópsias ganglionares, 2/20 biópsias hepáticas, 1/6 aspirados de medula óssea, 2/17 líquidos ascíticos, 1/38 líquidos pleurais e 1/20 amostras de urina.

O rendimento individual dos procedimentos laboratoriais em relação às amostras pertencentes aos pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar, está representada na Tabela II. A baciloscopia foi positiva em 14/28 das amostras com diagnóstico de tuberculose pulmonar, respectivamente 7 escarros e 7 lavados broncoalveolares e, a cultura, em 26/28, sendo 8 escarros e 18 lavados broncoalveolares.

Na Tabela III está representado o rendimento individual dos procedimentos laboratoriais em relação às amostras pertencentes aos pacientes com diagnóstico de tuberculose extrapulmonar. A baciloscopia detectou BAAR em 11/18 amostras oriundas dos seguintes sítios: 8 biópsias ganglionares, um aspirado de medula óssea, um líquido ascítico e uma urina. Através da cultura foram isoladas micobactérias em 12/18 amos-

TABELA II
Rendimento dos procedimentos laboratoriais nas amostras com diagnóstico de tuberculose pulmonar

Materiais	Baciloscopia		Cultura	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Escarro	7/9	2/9	8/9	1/9
Lavado broncoalveolar	7/19	12/19	18/19	1/19
Total	14/28	14/28	26/28	2/28

TABELA III
Rendimento dos procedimentos laboratoriais nas amostras com diagnóstico de tuberculose extrapulmonar

Materiais	Baciloscopia			Cultura		
	Pos	Neg	NR	Pos	Neg	Cont
Biópsia ganglionar	8/11	2/11	1/11	6/11	4/11	1/11
Aspirado de medula óssea	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
Líquido ascítico	1/2	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2
Urina	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
Biópsia hepática	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
Líquido pleural	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
Total	11/18	4/18	3/18	12/18	4/18	2/18

Pos=positivo; Neg=negativo; NR=não realizado; Cont=contaminado

TABELA IV
Procedimento responsável pelo diagnóstico
de tuberculose pulmonar e extrapulmonar
no total de amostras analisadas

Método	Amostras positivas			
	Pulmonar		Extrapulmonar	
	Nº	%	Nº	%
Baciloscopia	02	1,3	06	2,7
Cultura	14	9,3	07	3,2
Ambas	12	8,0	05	2,3
Total de amostras	28	18,6	18	8,2

tras, respectivamente 6 biópsias ganglionares, duas biópsias hepáticas, um aspirado de medula óssea, dois líquidos ascíticos e um líquido pleural. Em duas amostras com baciloscopia positiva, a cultura apresentou, nas primeiras 48 horas, crescimento de bactérias não álcool-ácido resistentes consideradas contaminantes, impossibilitando a detecção de micobactérias.

Conforme Tabela IV a baciloscopia foi a única responsável pelo diagnóstico da tuberculose pulmonar em 2/150 amostras, a cultura em outras 14/150 e ambas, em 12/150. Para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar a baciloscopia contribuiu em 6/222 amostras, a cultura em 7/222 e, em 5/222, os dois métodos foram concomitantemente positivos.

A prevalência de *M. tuberculosis* entre as 38 amostras de micobactérias isoladas foi de 97,4% (37). Uma amostra, 2,6%, isolada a partir de aspirado de medula óssea foi identificada como pertencente a outra espécie que não *M. tuberculosis* e, posteriormente, como *M. avium-intracellulare* no Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Rio de Janeiro.

DISCUSSÃO

Nos países em desenvolvimento a baciloscopia é o método disponível para estabelecer o diagnóstico da grande maioria dos casos de tuberculose através da detecção dos bacilíferos, principal fonte de infecção, propiciando a quebra da cadeia de transmissão da enfermidade. A realização da cultura amplia a cobertura diagnóstica possibilitando a detecção de BAAR em amostras clínicas paucibacilares, além da identificação da espécie micobacteriana e da verificação da resistência a drogas, levando à maior eficácia no tratamento da infecção⁹.

Dentre 150 amostras pulmonares analisadas em nosso laboratório, foi estabelecido o diagnóstico bacteriológico de tuberculose em 18,6% delas, sendo 1,3% somente pela realização da baciloscopia, 9,3% pela cultura e 8% por ambas. Por outro lado, em 222 amostras extrapulmonares o diagnóstico de doença micobacteriana foi fornecido unicamente pela baciloscopia em 2,7% dos casos, pela cultura em 3,2% e por ambas em 2,3%, com uma prevalência de 8,2%. A pesquisa de BAAR ao microscópio, rotineiramente utilizada nesse estudo por sua simplicidade, rapidez e alta especificidade¹⁰, é útil no diagnóstico precoce da tuberculose pulmonar e extrapulmonar, combinada a achados clínicos e radiológicos sugestivos da doença. Em geral, todo o BAAR detectado pela pesquisa direta deve ser considerado como *M. tuberculosis* até que se prove o contrário, resultando no início imediato do tratamento do paciente¹¹. Contudo, uma baciloscopia negativa não

descarta a possibilidade de tuberculose tanto pulmonar como extrapulmonar. Para obtenção de um resultado positivo na baciloscopia, é necessário pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos/mililitro de escarro ou concentração equivalente em outros tipos de amostras clínicas, em contraste com a cultura, que é uma metodologia mais sensível e que pode detectar a partir de 10 a 100 células viáveis por amostra⁸. Em nosso estudo observou-se que 14/26 das amostras pulmonares positivas ao cultivo apresentaram baciloscopia negativa e, das 12 amostras extrapulmonares positivas à cultura, 4 foram negativas à baciloscopia e em três não foi realizada. Considerando o total de amostras pulmonares e extrapulmonares provenientes de pacientes com suspeita de tuberculose, o rendimento da cultura foi 10,2% e o da baciloscopia 6,7%, demonstrando a maior rentabilidade da cultura para detecção de BAAR no presente estudo.

Dos materiais pulmonares com diagnóstico de tuberculose, 19 amostras de lavado broncoalveolar, mostraram um rendimento à baciloscopia de 36,8% e à cultura de 94,7%. Bammann e cols.¹² mostraram uma rentabilidade à pesquisa direta de BAAR em lavado broncoalveolar de 4 a 23 %, enquanto a cultura alcança índices de sensibilidade entre 52% e 95%, isto em doentes com tuberculose confirmada. Nos materiais pulmonares examinados, tivemos uma prevalência maior de lavado broncoalveolar (82/150) do que de escarro (68/150). Este dado, provavelmente deve-se ao número elevado de pacientes com AIDS (146/264) na população estudada. No paciente com manifestações respiratórias, na falta de secreção pulmonar, a rotina no serviço de AIDS do Hospital Universitário da FURG realiza a broncoscopia para a coleta e posterior análise do lavado broncoalveolar quanto à presença de BAAR, de fungos e de células neoplásicas. Tal procedimento propiciou um acréscimo no diagnóstico de tuberculose neste estudo, representado por 19 pacientes.

Dos materiais extrapulmonares analisados aquele que apresentou maior rendimento quanto ao diagnóstico de tuberculose extrapulmonar, foi a biópsia ganglionar. Neste estudo, em 20% das biópsias ganglionares examinadas, foi detectado BAAR à baciloscopia e/ou à cultura. Shafer e cols.¹³ mostraram que cerca de 90% dos materiais de biópsia de gânglios suspeitos de tuberculose continham BAAR, enquanto outros autores encontraram uma rentabilidade de 70 a 90% ao exame bacteriológico direto e de 74 a 100% à cultura^{14,15}. É importante ressaltar que na rotina do serviço de AIDS do Hospital Universitário, em todo gânglio, suspeito ou não, apresentado pelo paciente, é realizada uma biópsia e o material examinado quanto à presença de BAAR, de fungos e de células neoplásicas, o que poderia justificar a relativa baixa rentabilidade dos exames bacteriológicos, comparada com a detectada pelos outros grupos citados.

O rendimento da biópsia hepática e da biópsia de medula óssea na tuberculose disseminada (16 a 66%) é controversa, sendo nos pacientes imunodeprimidos mais contributivas¹⁴. Em nosso estudo, das 18 amostras com diagnóstico de tuberculose extrapulmonar, três tiveram o diagnóstico de tuberculose disseminada confirmado pelo isolamento de micobactéria, sendo dois materiais de biópsia hepática e um aspirado de medula óssea. A baciloscopia determinou o diagnóstico precoce de tuberculose disseminada a partir

da detecção de BAAR na amostra de aspirado de medula óssea. As amostras citadas eram provenientes de três pacientes com AIDS.

Por outro lado, resultados positivos à baciloscopia e negativos à cultura são relatados em espécimes clínicos de pacientes submetidos a tratamento para tuberculose¹⁶. Ainda, resultados falso-positivos da baciloscopia podem ocorrer em razão de fatores ligados ao procedimento laboratorial¹⁷. Entre as amostras pulmonares, duas foram positivas ao exame direto e negativas à cultura, enquanto as extrapulmonares, 6 foram positivas à baciloscopia, não apresentando crescimento ao cultivo. Das 6 amostras extrapulmonares positivas à baciloscopia, duas tiveram crescimento de contaminantes dentro das primeiras 48 horas do cultivo e uma apresentou à baciloscopia alinhamento paralelo de fileiras de bacilos (formação em cordões)¹⁸. Das demais amostras com baciloscopia positiva e cultura negativa, uma pertencia a paciente com tratamento prévio para tuberculose e as restantes a pacientes que não relataram tratamento prévio com tuberculostáticos.

O número elevado de amostras extrapulmonares (222/372), examinadas em nosso laboratório, relaciona-se com a busca de tuberculose extrapulmonar nos pacientes com AIDS. Os pacientes infectados pelo HIV são particularmente propensos à tuberculose extrapulmonar, a qual muitas vezes se apresenta com manifestações clínicas inespecíficas, insidiosas e cuja gravidade freqüentemente é devida ao diagnóstico tardio¹⁴.

A cultura foi o método de eleição para o diagnóstico tanto da forma pulmonar como extrapulmonar de tuberculose enquanto, a contribuição da baciloscopia como método de diagnóstico precoce dos casos suspeitos de tuberculose, foi de 9,5% possibilitando o tratamento adequado do paciente.

Os resultados obtidos em relação ao rendimento dos métodos utilizados nos leva a recomendar o uso concomitante sistemático de ambos para o diagnóstico de tuberculose em todos os pacientes com sintomas clínicos e/ou radiológicos sugestivos desta enfermidade.

A predominância de cepas de *M. tuberculosis*, 97,4%, isoladas dos pacientes em estudo, está de acordo com a encontrada em serviços de atendimento primário e secundário de saúde do RS e outros estados do Brasil^{19,20}, comprovando que a situação epidemiológica das micobacterioses, em parte, permanece inalterada. Constatação fundamental para a validação do esquema de tratamento inicial para tuberculose preconizado pelo Ministério da Saúde, extremamente eficaz, com níveis de insucesso muito baixos para o *M. tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. <http://www.funasa.gov.br>, 2000.
2. Paulott, W.; Gutierrez, R. S. Vigilância Epidemiológica do Programa. In: Picon, P. D.; Rizzon, C. F.; Ott, W. P. Tuberculose, epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.159-224, 1993.
3. Ministério da Saúde/Brasil. Boletim Epidemiológico – AIDS. Brasília, 14:7-14, 2001.
4. Susemihl, M. A. M. M.; Ferrazoli, L.; Ueki, S. Y. M., Gimenez, R. D.; Palacim, M. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. 29(2):51-54, 1993.
5. Castro, K. G.; Ward, J. W.; Slutsker, L.; Buehler, J. W.; Jaffe, H. W.; Berkelman, R. L.; Curran, J. W. Revised classification system for VIH infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Clinical Infectious Diseases*. 17(4):802-810, 1993.
6. David, H.; Frebault, V. L.; Thorel, M. F. *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Instituto Pasteur. Paris, p.24, 1989.
7. Kudoh, S.; Kudoh, H. T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin of the World Health Organization*. 51:71-82, 1974.
8. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2ª edição, Ministério da Saúde/Brasil, Rio de Janeiro, 1994.
9. Consenso Brasileiro de Tuberculose 1 – 1997. *Jornal de Pneumologia*. 23(6):294-342, 1997.
10. Roberts, G. D.; Koneman, E. W.; Kim, Y. K. Mycobacterium. In: Balows, A.; Hausler Jr, W. J.; Hermann, K. L.; Isenberg, H. D.; Shadomy, H. J. *Manual of clinical microbiology*. 5th edition, American Society for Microbiology, Washington, DC, 304-339, 1991.
11. Hopewell, P. C. Impact in the epidemiology, clinical features, management, and control of tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 15(3):540-547, 1992.
12. Bammann, R. H.; Fernandes, A.; Vasquez, C. M. P.; Araújo, M. R. E.; Leite, K. R. M. Broncoscopia no diagnóstico de tuberculose: papel da biópsia transbrônquica em imunocompetentes e em HIV-positivos. *Jornal de Pneumologia*. 25(4):207-212, 1999.
13. Shafer, R. W.; Edlin, B. R. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clinical Infectious Diseases*. 22:682-704, 1999.
14. Stelianides, S.; Belmatoug, N.; Fantin, B. Manifestations et diagnostic de la tuberculose extrapulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires*. 14:5S72-5S87, 1997.
15. Valente, M. S.; Chieira, L. Tuberculose extrapulmonar: revisão teórica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. V(1):75-89, 1999.
16. Kim, T. C.; Blackmen, R. S.; Heatwole, K. M.; Kim, T.; Rochester, D. F. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Diseases*. 129:264-268, 1984.
17. Harries, A. D.; Mahe, R. D. *TB/HIV – Manual clínico para o Brasil*. Organização Mundial da Saúde. p.45, 1998.
18. Boffo, M. M. S.; Mattos, I. G.; Ribeiro, M. O.; Jardim, S. V. Tuberculose extrapulmonar em pacientes com AIDS na cidade do Rio Grande, Brasil. Diagnóstico laboratorial. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. VI:277-282, 2000.
19. Ferreira, R. L. T.; Jardim, S. B. V.; Ribeiro, M. O.; Kappke, F. Predomínio de *Mycobacterium tuberculosis* entre as cepas isoladas em pacientes de hospital geral do RS. In: *Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Rio de Janeiro. p.315, 1997.
20. Ailly, D. C. G.; Shikana, M. L.; Silva, R. M. Perfil do diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar na região de Campinas – 1999. In: *Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Foz do Iguaçu. p.432, 2001.

Endereço para correspondência

Profª Maria Marta Santos Boffo

Rua Marechal Deodoro, 278 - 96211480 - Rio Grande, RS

Tel. (0xx53)232-6270

E-mail: dpammsb@super.furg.br

II Encontro de Militares da área de Análises Clínicas

O evento será realizado durante o XXX CBAC e III CBCC, de 8 a 12 de junho de 2003, no Rio de Janeiro, podendo os contatos serem feitos com o Capitão-de-Corveta Rogério Dias, telefone (0xx21) 3860-0723 ou 2771-8320 e e-mail: 08@lfm.mar.mil.br, no Rio de Janeiro e com o Cel. Francisco Einstein Nascimento, telefone (0xx85) 256-2867 e e-mail: einstein@mcnet.com.br, em Fortaleza, Ceará.

Incidência de parasitos intestinais em material sub-ungueal e fecal em crianças da Creche Aprisco - Fortaleza, CE*

Incidence of intestinal parasites in sub-nail and fecal materials in children of Daycare Center Aprisco - Fortaleza, CE

Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra¹; Maria de Fátima Oliveira¹; Ana Leonor de Lima Miranda²; Marta Cristhiany Cunha Pinheiro² & Rosângela Maria Araújo Teles²

RESUMO – Dentre as doenças que ocorrem na infância, os parasitos intestinais têm uma grande importância em medicina social. Admitindo o possível papel do material sub-ungueal na transmissão das enteroparasitoses foram analisadas amostras de material sub-ungueal e fecal de 47 crianças da Creche Aprisco de ambos os sexos de 1 a 6 anos de idade, através dos métodos de Hoffman e direto. Das 47 amostras de fezes e sub-ungueal analisadas 41 (87%) e 21 (44,7%) apresentaram resultados positivos, respectivamente, para um ou mais parasitos. Nós observamos um índice de 68,8% para protozoários contra 31,2% para helmintos em fezes, enquanto que no material sub-ungueal a ocorrência foi de 76,2% contra 23,8%. A maior ocorrência de material sub-ungueal foi na faixa etária entre 1-3 anos enquanto que nas fezes a faixa etária mais acometida foi de 4-6 anos. Os parasitos achados com maior frequência nas amostras sub-ungueais foram *Entamoeba coli* (15%) e *Hymenolepis nana* (8%). Não obstante, nas fezes a ocorrência maior foi para *Giardia lamblia* (38,1%) e *Ascaris lumbricoides* (40%). Nós concluímos que existe correlação entre o tipo de parasita achado nas fezes e nas unhas indicando a provável participação dos depósitos sub-ungueais na transmissão dos parasitos.

PALAVRAS-CHAVE – Enteroparasitos, sub-ungueal, crianças.

SUMMARY – From the diseases who occurred in infancy, the intestinal parasites have a big importance in social medicine. Admitting a possible role of sub-nail materials in the transmission of enteroparasites, samples were analyzed of sub-nail and fecal materials of 47 children from Daycare Center Aprisco, both sex and age from 1 to 6 years old through the direct and Hoffmann method. From the 47 stool samples and sub-nail depositions analyzed, 41 (87.2%) e 21 (44.7%), respectively were positive for one or more parasites. In feces we observed the index of 68.8% for protozoa against 31.2% for helminths, while in the sub-nails materials the occurrence was 76.2% against 23.8%. In sub-nail and fecal materials, the most occurrence was observed among 1 to 3 and 4 to 6 years old, respectively. The most frequently parasites founded in sub-nails materials were the *Entamoeba coli* (15%) and *Hymenolepis nana* (8%), as well in feces the biggest occurrence were to *Giardia lamblia* (38.1%) and *Ascaris lumbricoides* (40%). We concluded that exists correlation between the parasites type found in feces and nails, indicating the probable participation of sub-nail depositions in the parasites transmission.

KEYWORDS – Intestinal parasites, sub-nails, children.

INTRODUÇÃO

Os parasitos intestinais têm acentuada importância, uma vez que representam altas taxas de incidência em países tropicais como o Brasil e acometem principalmente crianças de baixa faixa etária ou subnutridas provenientes de comunidades de baixa condição sócio-econômica^{1,2,7,8}. Esse problema se agrava em crianças que frequentam creches, especialmente aquelas oriundas de periferias sem saneamento básico e de famílias com baixa nível escolar^{3,7}. A preocupação com tal enfermidade advém das consequências que provocam principalmente nas crianças tais como: má absorção, diarreia e anemia⁷.

Os helmintos e protozoários contaminam o ambiente eliminando seus ovos, larvas ou cistos junto às fezes. Na falta de saneamento, os ovos e cistos, levados pela poeira podem contaminar alimentos, a água e o ambiente acometendo adultos e principalmente crianças. O hábito de higiene da população que vive em condições subhumanas é o fator decisivo no controle das parasitoses intestinais⁷, além de um programa de saneamento básico eficiente por parte das autoridades competentes.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a incidência de parasitos intestinais tanto em material fe-

cal como sub-ungueal, presentes nos internos da Creche Aprisco, como também implantar um programa de prevenção e combate destes parasitos, procurando orientar as crianças e seus pais sobre higiene pessoal e coletiva a fim de evitar a contaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

A Creche Aprisco é uma instituição mantida pela FE-BEMCE (Fundação do Bem Estar do Menor do Ceará) e atende crianças residentes nos bairros Rodolfo Teófilo e Porangabussú. A instituição possui água tratada e rede de esgoto, além de ser muito bem assistida por programas na área de Saúde que são realizados por diversos cursos da Universidade Federal do Ceará. As crianças atendidas nessa creche são caracterizadas como de baixo nível sócio-econômico.

Foram incluídas no estudo 47 crianças de ambos os sexos, 27 (57%) do sexo masculino e 20 (43%) do sexo feminino, na faixa etária de 1-6 anos. De cada criança foram coletadas amostras sub-ungueal e fecal. O material sub-ungueal foi obtido com o auxílio de uma fina espátula, e colocado em recipientes de vidro previamente identificados. No laboratório o material foi diluído com

Recebido em 23/9/2002
Aprovado em 15/10/2002

¹Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos, da Univ. Federal do Ceará; ²Acadêmicas do curso de Farmácia, da Univ. Federal do Ceará

água, centrifugado a baixa velocidade e o sedimento analisado para pesquisa de ovos e cistos de parasitos. As amostras de fezes foram analisadas pelos métodos de Hoffmann⁴ e Direto.

RESULTADOS

Das 47 amostras de material subungueal analisado, 16 (34%) foram positivas. Dos parasitos encontrados os protozoários apresentaram uma maior ocorrência (76,2%). A faixa etária mais acometida foi a de 1-3 anos (Tabela I).

Das 47 amostras de material fecal, 38 (81%) apresentaram-se positivas. Dos parasitos encontrados os protozoários apresentaram uma maior ocorrência (68,8%), sendo que a faixa etária mais acometida foi de 4-6 anos (Tabela II).

Observamos que 13 (28%) das amostras apresentaram parasitos tanto no material fecal quanto no subungueal, destas 7 (15%) apresentaram o mesmo perfil parasitário.

TABELA I
Incidência de helmintos e protozoários nas crianças da Creche Aprisco, encontrados em material subungueal, por faixa etária

Protozoários	Faixa etária				Total	
	1-3 anos		4-6 anos			
	N°	%	N°	%	N°	%
<i>Entamoeba coli</i>	5	11	2	4	7	15
<i>Entamoeba histolytica</i>	4	8	1	2	5	11
<i>Giardia lamblia</i>	2	4	2	4	4	8
Helmintos	N°	%	N°	%	N°	%
<i>Hymenolepis nana</i>	2	4	2	4	4	8
<i>Trichuris trichiura</i>	1	2	-	-	1	2

TABELA II
Incidência de helmintos e protozoários nas crianças da Creche Aprisco, encontrados em material fecal, por faixa etária

Protozoários	Faixa etária				Total	
	1-3 anos		4-6 anos			
	N°	%	N°	%	N°	%
<i>Giardia lamblia</i>	12	25	12	25	24	50
<i>Entamoeba coli</i>	6	13	9	19	15	32
<i>Endolimax nana</i>	3	6	10	21	13	27
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	2	5	11	6	13
<i>Iodamoeba butschlii</i>	3	6	-	-	3	6
<i>Cryptosporidium</i> sp	2	4	1	2	3	6
<i>Chilomastix mesnili</i>	-	-	2	4	2	4
Helmintos	N°	%	N°	%	N°	%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	2	11	23	12	25
<i>Trichuris trichiura</i>	2	4	8	17	10	21
<i>Hymenolepis nana</i>	1	2	7	15	8	17

DISCUSSÃO

Apesar das boas condições da creche, bem como a assistência dispensada a mesma, que inclusive contam com atendimento médico, odontológico, de enfermagem, e farmacêutico, as crianças apresentaram uma elevada ocorrência de parasitos tanto no material subungueal como no fecal, fato este já bastante relatado na literatura^{2,3,5,6}. Observa-se que a incidência dos parasitos cuja transmissão se dá por via oral, veiculados através da água, alimentos contaminados e unhas sujas (de onde foi coletado o material sub-

ungueal) é elevada, sendo indicativos das condições socioeconômicas das famílias que utilizam os serviços da creche. Este fato é de fundamental importância e não deve ser negligenciado nas pesquisas de doenças parasitárias³. A predominância de *Ascaris lumbricoides* observada em vários trabalhos realizados em creches e escolas de ensino fundamental^{2,5,6,8} não foi observado em nosso estudo provavelmente devido ao uso indiscriminado de anti-helmínticos pela própria população que se automedica, sem a realização de exames parasitológicos. A grande prevalência de protozoários no material subungueal evidencia o fato que a giardia e a ameba podem ser transmitidas de pessoa para pessoa, tornando-se possível o contágio no material subungueal, como evidenciamos principalmente na faixa etária de 1 a 3 anos. É importante o tratamento das crianças que possuem parasitoses, a fim de evitar a contaminação do restante dos internos e além disso, se faz necessário palestras sobre higiene pessoal e coletiva com o intuito de minimizar este problema. Se não houver uma boa orientação quanto aos métodos usados para evitar a contaminação, em pouco tempo estas crianças poderão estar novamente infectadas e pondo em risco o restante da população estudada. É importante também informar aos responsáveis o cuidado que deve ser dispensados aos objetos que entram em contato com a criança⁷, bem como a importância de lavar as mãos periodicamente uma vez que, a educação sanitária demonstra ser um fator relevante para a melhoria da saúde da população até mais que o próprio saneamento ambiental¹. Um dado bastante relevante é a quantidade de amostras (15%) que apresentaram o mesmo parasito tanto no material fecal quanto sub-ungueal, o que nos indica que pode estar ocorrendo autoinfecção externa nestas crianças e isto pode ser devido aos maus hábitos higiênicos existentes nesta população. Algumas crianças (13%) apresentaram parasitos diferentes no material fecal e sub-ungueal, isto pode ser um indicativo de que pode estar ocorrendo infecções cruzadas entre as crianças devido à aglomeração destas.⁶ Programas de reavaliação da qualidade do saneamento e programas contínuos de educação sanitária devem ser realizados, objetivando minimizar a ocorrência destas infecções.

REFERÊNCIAS

1. Branco Júnior, A. C.; Rodrigues, J. C. Importância de aspectos sanitários e educacionais na epidemiologia de enteroparasitoses em ambientes rurais. *RBAC*, v.31:87-90, 1999.
2. Carneiro Filho, M.; Ferreira, R. F.; Garcia, C. E. Incidência de enteroparasitas em crianças de Joinville (SC). *J. B. M.* v.67:167-170, 1994.
3. Coelho, L. M. P. S.; Sobrinho, T. A.; Oliveira, S. M.; Ikegami, M. T.; Yoshizumi, A. M.; Nakamoto, A. Y. K.; Brotto, S. A.; Felberg, S.; Maiorano, M. R. Ovos e larvas de helmintos nos sanitários de pré-escolas municipais de Sorocaba, SP e suas freqüências nas fezes das crianças. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.32:647-652, 1999.
4. Hoffmann, N. A.; Fons, J. A.; Janer, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *J. Public Hlth*, v.9:283-91, 1934.
5. Monteiro, C. A.; Chieffi, P. P.; Benicio, M. H. D.; Dias, R. M. S.; Torres, D. M. A. G. V.; Mangini, A. C. S. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. *Rev. Saúde Pública*, v.22:8-15, 1988.
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. *RBAC*, v.29:195-196, 1997.
7. Pedroso, R. S.; Siqueira, R. V. Pesquisa de cistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos em chupetas. *Jornal de Pediatria*, v.73: 21-25;1997.
8. Pupulim, A. R. T.; Guilherme, A. L. F.; Falavigna, D. L. M.; Araújo, S. M.; Fukushigue, Y. Uma tentativa de orientar escolares no controle de parasitoses. *RBAC*, v.28:130-133, 1996.

Endereço para correspondência

Dr. Fernando S. de M. Bezerra
Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1.210, Rodolfo Teófilo
60.430-370 - Fortaleza, CE
Tel. (0xx85)288-8265 - Fax (0xx85)288-8292
E-mail: bezerra@ufc.br

Estudo sobre as possíveis vias de transmissão do Herpesvírus Humano tipo 8

Study about possible routes in the transmission of Human Herpesvirus 8

Vivian de Lima Spode & Virgínia Minghelli Schmitt¹

RESUMO – O Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV-8) ou Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) é conhecido como o agente causador do Sarcoma de Kaposi (SK). O contato sexual entre homens é uma importante via de transmissão do HHV-8, pois esse é o principal fator de risco de contágio em pacientes soropositivos para HIV. Em algumas regiões da África onde o SK tem sido evidenciado em crianças, mesmo depois da descoberta da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), outras rotas de transmissão também têm sido discutidas.

PALAVRAS-CHAVE – Transmissão do Herpesvírus Humano Tipo 8, Sarcoma de Kaposi, Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi.

SUMMARY – Human Herpesvirus 8 (HHV-8) or Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) has been causally linked to Kaposi's Sarcoma (KS). Sex between men may be an important route of transmission of HHV-8, once this is the main behavioral risk factor for KS in seropositive HIV patients. However, from regions of Africa where KS was detected in children even before the advent of AIDS, other routes of transmission have been suggested.

KEYWORDS – Human Herpesvirus 8 transmission, Kaposi's Sarcoma, Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus.

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8) ou Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) foi descoberto em 1994 por Chang & Moore. Ele pertence à subfamília *Gamma-herpesvirinae* e tem seqüências de DNA homólogas ao EBV e ao *Herpesvírus siamari* (vírus de primatas)^{2,27}.

Um possível mecanismo proposto para a patogenicidade do HHV-8 seria a síntese de produtos homólogos a receptores celulares que são importantes no crescimento e diferenciação celular, enzimas e proteínas que estimulam a divisão celular, inibem a apoptose e modulam a função imune, produzindo, dessa forma, efeitos carcinogênicos^{3,27}.

O HHV-8 ocorre em todos os tipos de sarcoma de Kaposi (SK) e, também, é encontrado em outros tipos de malignidades, tais como: linfoma por efusão primária, doença de Castleman's e mieloma múltiplo^{7,13,25,26}.

O SK é uma malignidade que ocorre freqüentemente associado à AIDS, podendo ser classificado em 4 formas distintas: clássico (que acomete anciãos em países mediterrâneos); endêmico (encontrado na África, ocorrendo em crianças e adultos); iatrogênico (associado à imunossupressão) e epidêmico (associado à AIDS)^{10,21}. A forma de SK associado à AIDS é a forma mais agressiva, ocorrendo lesões na pele e vísceras com progressão variável, desde lesões pequenas na pele até lesões malignas em vários órgãos internos²⁹.

A epidemiologia do HHV-8 ainda não está muito bem caracterizada. A incidência do SK em pacientes soropositivos para HIV é muito mais elevada em homossexuais ou bissexuais masculinos do que em pacientes

hemofílicos contaminados através de transfusão sanguínea ou em usuários de drogas injetáveis^{4,11,20,23}. Isso sugere que a transmissão do vírus possa ocorrer por via sexual ou através de contato oral-fecal²³. A transmissão também poderia ocorrer via saliva, pois o DNA do HHV-8 foi detectado na saliva de pacientes com SK e HIV+, sugerindo que o ato sexual não seja a única rota de transmissão¹⁸. O SK acomete crianças muito jovens na África, indicando que ocorra transmissão vertical do HHV-8, principalmente em regiões endêmicas³⁰.

Este trabalho tem por objetivo apresentar as possíveis vias de transmissão do HHV-8 através de revisão bibliográfica.

Referencial teórico

HHV-8

O Herpesvírus Humano tipo 8 é um gammaherpesvírus do gênero *Rhadinovirus*^{8,27}.

O genoma do HHV-8 é constituído de uma dupla fita de DNA linear, com aproximadamente 165 Kb e possui mais de 80 ORFs (*Open Reading Frames*) arrançadas em uma longa e única região flanqueada por múltiplas unidades terminais de 801 pb ricas em G e C (Fig. 1). Essa região codificante contém genes conservados na maioria dos herpesvírus, intercalados com seqüências de genes não homólogos, que são específicos do HHV-8⁸.

O HHV-8 possui 12 genes que têm homologia celular, incluindo genes que codificam produtos estimuladores da divisão celular, inibidores da apoptose e moduladores da função imune. Quatro genes do HHV-8 têm propriedades de transformação do crescimento celular. Os genes envolvidos no crescimento e regula-

Recebido em 5/11/2002

Aprovado em 9/12/2002

¹Instituto de Pesquisas Biomédicas e Faculdade de Farmácia da PUCRS.

ção imune estão claramente relacionados com a patogênese do HHV-8, no entanto, essa regulação não está totalmente definida²⁷.

Os níveis de replicação do HHV-8 são muito mais altos em pacientes com SK do que em pacientes sem SK. Isso mostra que a replicação do HHV-8 é provavelmente cíclica, podendo ficar latente em pacientes imunologicamente competentes, assim como outros herpesvírus¹⁷.

O HHV-8 tem sido encontrado em mais de 95% dos casos de SK, mas também em algumas formas de linfoma Hodgkin's e não-Hodgkin's, chamado de linfoma por efusão primária (PELs) ou linfoma de células de cavidades do corpo (*Body-Cavity-Based* - BCBLs), em doença linfoproliferativa angiofolicular (Doença de Castleman's), em mieloma múltiplo e principalmente em pacientes HIV positivos⁸.

Sarcoma de Kaposi

As lesões causadas pelo SK são classificadas clinicamente em 6 tipos de manifestações: manchas, placas, nódulos, linfadenomas, infiltrações e pele rosada (Fig. 2). Outras variantes, como telangiectasia são raramente observadas. Linfodema generalizado, equimoses e quelóides são formas descritas mais recentemente do SK⁶.

O linfadenoma ocorre freqüentemente em pacientes HIV+, especialmente na face e extremidades, mas sem lesões cutâneas⁶.

Além disso, as manifestações do SK na pele podem envolver várias mucosas, principalmente a cavidade oral e trato gastrointestinal. O envolvimento de órgãos internos é bastante freqüente e ocorre em aproximadamente 10% dos casos, podendo acometer pulmões, linfonodos (superficiais ou profundos), baço, fígado e medula óssea²³.

Epidemiologia do HHV-8

A forma clássica do SK ocorre principalmente em anciãos de países mediterrâneos. O SK é considerado como endêmico na África, pois é encontrado em crianças, jovens, adultos e idosos, tanto homens como mulheres, sendo mais agressivo do que o SK clássico^{10,21}.

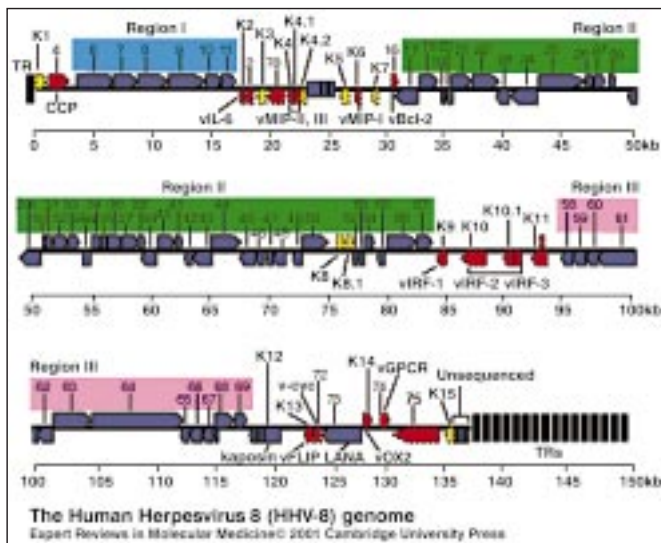


FIG. 1 - Representação esquemática do genoma do HHV-8.

A incidência do SK entre pacientes transplantados e outros pacientes que são submetidos à terapia imunossupressora tem aumentado nos últimos 20 anos, ficando conhecido como SK pós-transplante ou SK iatrogênico. Atualmente, a forma de SK associado à AIDS tem sido bastante comum, sendo considerado epidêmico^{10,21}.

O HHV-8 é comumente encontrado em homens homossexuais HIV+ ou não, ocasionalmente em homens e mulheres heterossexuais com HIV, e extremamente raro em crianças²².

A infecção pelo HHV-8 não está associada com idade, educação, raça ou grupo étnico, mas está associada com o grau de atividade homossexual. Na população homossexual ou bissexual é provável que haja uma infecção intestinal específica por exposição oral-fecal²⁰.

Transmissão do HHV-8

A transmissão sexual do HHV-8 já foi comprovada e depende do número de parceiros e do tempo de atividade homossexual do paciente. A prevalência do HHV-8 na população heterossexual é bastante baixa, sugerindo que essa forma de transmissão não seja comum e que a via sexual não seja a única rota de transmissão³⁰.

Outras formas de transmissão têm sido evidenciadas em áreas endêmicas, como transmissão horizontal, parenteral e vertical¹².

Estudos buscando a presença de DNA do HHV-8 em cérvix uterina de mulheres soropositivas para HIV e em sêmen de homens homossexuais HIV+ apresentaram uma positividade semelhante na maioria dos casos (27% e 20% respectivamente)^{12,28}.

No estudo de Whiby em 1999, o DNA do HHV-8 foi detectado em três de 11 amostras de cérvix uterina de mulheres soropositivas para o HHV-8, sugerindo que a transmissão do HHV-8 via contato vaginal é possível, apesar da detecção do DNA viral não provar a presença de vírus ativo nem capacidade de replicação viral no trato genital³⁰.

A prevalência de HHV-8 entre familiares indica alto risco de exposição, em contatos estreitos, sugerindo que possa ocorrer a transmissão horizontal, principalmente através da saliva¹⁸.

Outros herpesvírus, incluindo CMV, HSV e provavelmente o HHV-6 e 7, podem ser transmitidos pela sa-



FIG. 2 - Esquema de uma lesão causada pelo HHV-8 na pele.

liva. Há a hipótese de que o HHV-8 também tenha a capacidade de replicação na orofaringe e que a partícula viral esteja presente na saliva^{1,4}. O número de cópias de DNA do HHV-8 encontrado na saliva é muito mais alto do que em outros tecidos, demonstrando assim, que a saliva pode ser um fator de risco para infecção^{9,22}.

Um estudo mostrou que menos de 10% dos pacientes HIV+ sem SK apresentaram DNA de HHV-8 em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) enquanto que 70% das amostras de tecido oral sem SK e HIV+ apresentaram DNA do HHV-8. Portanto, é improvável que a alta positividade para HHV-8 encontrada em tecido oral seja devido à infiltração de células sanguíneas infectadas³¹.

Pacientes que possuem SK clássico ou associado à AIDS nem sempre apresentam DNA de HHV-8 em CMSP, mas nos casos em que isso ocorre, é muito provável que o vírus possa replicar-se nessas células¹.

A baixa prevalência e número de cópias do DNA do HHV-8 no plasma indica que não há associação entre transfusão de produtos do plasma com SK. No entanto, a alta prevalência e número de cópias do DNA do HHV-8 nas CMSP sugerem que há transmissão do vírus por transfusão de produtos celulares do sangue¹⁶.

Está sendo estudada a transmissão do HHV-8 de mãe para filho. Em um trabalho realizado por Whiby em 1999, todos os casos de HHV-8 + em amostra de cérvix uterina eram de mulheres africanas, sendo provável este tipo de transmissão, principalmente em região endêmica, durante o parto^{19,30}. No entanto, estudos realizados por Lyall em 1999, com uma população predominantemente africana, mostraram que a transmissão vertical não é comum. Não se sabe exatamente quando a criança é infectada, mas é provável que seja depois do nascimento e que o HHV-8 seja transmitido pela saliva. Além disso, até o momento não foi relatado nenhum caso de transmissão vertical do HHV-8 (*antepartum*, *peripartum* ou *postpartum*). Ainda não está esclarecido se o HHV-8 atravessa a placenta, se ele é secretado no leite materno e se pode haver transmissão através do contato genital durante o parto¹⁷.

CONCLUSÃO

A rota de transmissão do HHV-8 parece estar associada com relação sexual entre homossexuais, provavelmente por contato oral-fecal e em HIV+. A incidência em heterossexuais é muito baixa.

Não há indícios de infecção do HHV-8 em pacientes que fizeram transfusão sanguínea ou que fizeram uso de drogas injetáveis. Porém, pacientes que fazem uso de drogas ficam mais suscetíveis à infecção pelo HIV e adquirem o HHV-8 devido à imunossupressão.

Além disso, a saliva pode ser uma via de transmissão importante, podendo explicar a incidência do HHV-8 em crianças. Quanto à transmissão vertical, não há dados suficientes para sua comprovação, pois os estudos possuem pequeno número amostral.

São necessários estudos mais detalhados e com uma amostragem maior para que se possa determinar efetivamente as vias de transmissão de HHV-8.

REFERÊNCIAS

1. Ablashi, D. V.; Chatlynne, L. G.; Whitman, J. E.; Cesarman, E. Spectrum of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus, or Human Herpesvirus 8, Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:439-464, 2002.

2. Ansari, M. Q.; Dawson, D. B.; Nador, R.; Rutherford, C.; Scheider, N. R. et al. Primary body cavity based AIDS-related lymphomas. *American Journal Clinical Pathology*. 105:221-229, 1996.

3. Arvanitakis, L.; Geras Raaka, E.; Varma, A.; Gershengorn, M. C.; Cesarman, E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 385:347-350, 1997.

4. Beral, V.; Bull, D.; Darby, S.; Weller, I.; Carne C. et al. Risk of Kaposi's sarcoma and sexual practices associated with faecal contact in homosexual or bisexual men with AIDS. *Lancet*. 339:632-635, 1992.

5. Beral, V.; Peterman, T. A.; Berkelman, R. L.; Jaffe, H. W. Kaposi's sarcoma among person's with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*. 335:123-128, 1990.

6. Boshoff, C.; Weiss, R. A. Aetiology of Kaposi's Sarcom: current understanding and implications for therapy. *Molecular Medicine Today*. p.488-494, 1997.

7. Cesarman, E.; Chang, Moore, P. S.; Said, J. W.; Knowles, D. M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. England Medical*. 332:1186-1191, 1995.

8. Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M. S. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 266:1865-9, 1994.

9. Corey, L.; Brodie, S.; Huang, M. L.; Koelle, D. M.; Wald, A. HHV-8 infection: a model for reactivation and transmission. *Reviews in Medical Virology*. 12:47-63, 2002.

10. Gonzalez, A.; Costa, P.; Romero, J.; dala Torre, A.; Valcarcel, F. et al. Kaposi's sarcoma unrelated to human immunodeficiency virus infection: long term results of radiotherapy. *Arch. Dermatol*. 133:107-108, 1997.

11. Hermans, P.; Lundgren, J.; Sommereijns, B.; Pedersen, C.; Vella, S. et al. Epidemiology of AIDS-related Kaposi's sarcoma in Europe over ten years. *AIDS*. 10:911-917, 1996.

12. Howard, M.; Whiby, D.; Bahadur, G. et al. Detection of human herpesvirus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. *AIDS*. 11:15-9, 1997.

13. Huang, Y.-Q.; Li, J.-J.; Kaplan, M. H. et al. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 345:759-61, 1995.

14. Iscovich, J.; Boffetta, P. et al. Classic Kaposi's Sarcoma: epidemiology and risk factors. *American Cancer Society*. p.500-517, 2000.

15. Koelle, D. M.; Huang, M. L.; Chandran, B.; Viera, J.; Piepkorn, M.; Corey, L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *Journal Infectious Diseases*. 176:94-102, 1997.

16. LaDuca, J. R.; Love, J. L.; Abbott, L. Z.; Dube, S.; Dube, S.; Freidman-Kien, A. E.; Poiesz, B. J. Detection of Human Herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *The Journal of Infectious Diseases*. 178:1610-15, 1998.

17. Lyall, H.; Patton, G. S.; Sheldon, J. et al. Evidence for horizontal and not vertical transmission of Human Herpesvirus 8 in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Journal of Pediatric Infectious Disease*. 18(9):795-799, 1999.

18. Lyall, H.; Patton, G. S.; Sheldon, J. et al. Human Herpesvirus 8 seroprevalence in children born to mothers with HIV infection. Presented at the 12th World AIDS Conference; Geneva Switzerland, 1998.

19. Mantina, H.; Kankasa, C.; Klaskala, W.; Brayfield, B.; Campbell, J.; Du, Q. et al. Vertical transmission of Kaposi's Sarcoma-associated. *Int. J. Cancer*. 94:749-752, 2001.

20. Martin, J. N.; Ganem, D. E.; Osmond, D. H.; Page-Shafer, K. A.; Macrae, D.; Kedes, D. H. Sexual transmission and the natural history of Human Herpesvirus 8 infection. *N. England J. Medical*. 338:948-54, 1998.

21. Martin III, R. W.; Hood, A. F.; Faemer, E. R. Kaposi's sarcoma. *Medical*. 72:261, 1993.

22. McCarthy, G. A.; Kampmann, B.; Novelli, V.; Miller, R. F.; Mercey, D. E. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma. *Arch. Dis. Child*. 74:455-7, 1996.

23. Pauk, J.; Huang, M. L.; Brodie, S. J.; Wald, A.; Koelle, D. M.; Schacker, T.; Celum, C.; Selke, S.; Corey, L. Mucosal shedding of Human Herpesvirus 8 in men. *N. England Journal Medical*. 343:1369-1377, 2000.

24. Renwick, N.; Halaby, T.; Weverling, G. J. et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS*. 12:2481-8, 1998.

25. Rettig, M. B.; Ma, H. J.; Vescio, R. A. et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science*. 276:1851-1854, 1997.

26. Soulier, J.; Grollet, L.; Oksenhendler, E. et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood*. 86:1276-1280, 1995.

27. Specter, S.; Hodinka, R. L.; Stephen, A. *Clinical virology manual*. 3rd ed. Washington. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. p.458, 2000.

28. Viviano, E.; Vitale, F.; Ajello, F. et al. Human Herpesvirus Type 8 DNA sequences in biological samples of HIV-positive and negative individuals in Sicily. *AIDS*. 11:607-12, 1997.

29. Wahman, A.; Melnick, S. L.; Potter, J. D. The epidemiology of Classic; African and immunosuppressed Kaposi's sarcoma. *Epid. Rev*. 13:178-199, 1991.

30. Whiby, D.; Howard, M. R.; Tenant-Flowers, M. et al. Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 346:799-802, 1995.

31. Whiby, D.; Smith, N. A.; Matthews, S.; O'Shea, S.; Sabin, C. A. et al. Human Herpesvirus 8: retroepidemiology among women and detection in the genital tract seropositive women. *The Journal of Infection Disease*. 179:234-6, 1999.

Endereço para correspondência

Profª Vivian de Lima Spode

Rua Ramiro Barcelos, 1925/22 - 90035-006 - Porto Alegre - RS

Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária no diagnóstico de doença hemolítica por defeito de membrana*

Electrophoresis of erythrocyte membrane and hemolytic diseases caused by membrane abnormalities

Paulo Roberto Favero¹; Maria Suely Soares Leonart² & Aguinaldo José do Nascimento³

RESUMO – A membrana eritrocitária contém as proteínas do citoesqueleto, e proteínas integrais, imersas na bicamada lipídica, todas importantes para a manutenção da integridade e da forma celular. Neste trabalho, estudou-se 14 pacientes portadores de doença hemolítica, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) em relação a grupo controle de 20 voluntários saudáveis. Amostras de sangue venoso foram coletadas em citrato-fosfato-dextrose (CPD). Após o isolamento das membranas [Dodge *et al.*, Arch.Biochem.Biophys. 100:199, 1963] e a determinação da concentração de proteínas [Lowry *et al.*, J.Biol.Chem. 193: 265, 1951], as proteínas foram submetidas à eletroforese vertical em SDS-Page [Laemmli, Nature 227: 680, 1970]. Os valores obtidos no grupo controle (%; n = 10), foram: espectrinas = $29,67 \pm 4,14$; anquirinas = $3,97 \pm 1,84$; banda 3 = $38,70 \pm 4,96$; banda 4.1 = $6,79 \pm 1,60$; banda 4.2 = $5,00 \pm 1,43$; banda 4.5 = $1,89 \pm 0,96$; banda 4.9 = $1,83 \pm 1,22$; banda 5 = $6,54 \pm 3,13$; banda 6.0 = $2,70 \pm 1,24$; banda 7.0 = $2,36 \pm 1,33$. Os valores médios para os portadores de esferocitose foram 24,4% para espectrina e 35,8% para banda 3 (teste t; p<0,05). A observação de esferócitos ou eliptócitos no sangue periférico, associados a um perfil eletroforético com deficiência de espectrina e/ou proteína 3 sugere esferocitose ou eliptocitose hereditária, respectivamente. Portadores assintomáticos de defeitos moleculares de membrana eritrocitária podem ser também detectados através de SDS-Page.

PALAVRAS-CHAVE – Proteínas de membrana eritrocitária; eliptocitose hereditária, esferocitose hereditária, morfologia eritrocitária, doenças hemolíticas.

SUMMARY – The erythrocyte membrane contains a net of proteins, forming the cell backbone, and the integral proteins, immersing in the lipid bilayer, both important for the integrity maintenance and for the cellular activity. We know studied 14 patient carriers of hemolytic diseases, assisted in the Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) in relation to control group of 20 healthy volunteers. Samples of venous blood were collected in citrate-phosphate-dextrose (CPD). The membranes were isolated [Dodge *et al.*, Arch.Biochem.Biophys. 100:199, 1963], the protein concentration was determined [Lowry *et al.*, J.Biol.Chem. 193: 265, 1951] and were submitted to the vertical electrophoresis (SDS-Page) [Laemmli, Nature 227: 680, 1970]. The values obtained in the control group (%; n = 10) were: spectrins = 29.67 ± 4.14 ; ankyrins = 3.97 ± 1.84 ; band 3 = 38.70 ± 4.96 ; band 4.1 = 6.79 ± 1.60 ; band 4.2 = 5.00 ± 1.43 ; band 4.5 = 1.89 ± 0.96 ; band 4.9 = 1.83 ± 1.22 ; band 5 = 6.54 ± 3.13 ; band 6.0 = 2.70 ± 1.24 ; band 7.0 = 2.36 ± 1.33 . The mean value for the spherocytosis carriers was 24.4% for spectrin and 35.8% for band 3, (t tests; p < 0.05). The observation of blood spherocytes or elliptocytes, associated to an electrophoretic profile with deficiency of spectrin or band 3 suggests spherocytosis or hereditary elliptocytosis, respectively. Assymptomatic carriers of erythrocyte membrane molecular abnormalities can also be detected through SDS-Page.

KEYWORDS – Red blood cell membrane proteins; hereditary elliptocytosis, hereditary spherocytosis, red blood cell morphology, hemolytic diseases.

INTRODUÇÃO

Dentre as anormalidades intrínsecas que acometem o eritrócito, os defeitos da membrana eritrocitária mais conhecidos incluem a esferocitose hereditária (HS), a eliptocitose hereditária (HE), a piropoiquilocitose hereditária (HPP) a acantocitose hereditária e a estomatocitose hereditária. O diagnóstico presuntivo de tais condições em geral se baseia em: exame clínico, anamnese e sinais de hemólise no hemograma, além da presença das formas eritrocitárias correspondentes e outras alterações da morfologia eritrocitária. No caso da HS há um aumento da fragilidade osmótica, em especial pela pre-

sença de esferócitos no sangue periférico. Nenhum destes dados laboratoriais, contudo, é tão específico que permita a confirmação do diagnóstico (Erslev, 1995).

A membrana eritrocitária contém uma rede de proteínas em unidades hexagonais, que formam o citoesqueleto, e as proteínas integrais imersas na bicamada lipídica, todas de fundamental importância para a manutenção da integridade e da forma celular, e classificadas pela sua mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (Bennett, 1981; Palek e Lux, 1983).

Este trabalho teve o objetivo de estudar alterações qualitativas e quantitativas das proteínas da membrana eritrocitária em indivíduos com diagnóstico presuntivo de HS e HE.

Recebido em 1/4/2002

Aprovado em 13/11/2002

*Trabalho realizado no Laboratório de Citologia e Hematologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, como parte de Dissertação de Mestrado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR; Apoio: CAPES e UFPR;

¹Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR;

²Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná;

³Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados para estudo, através de critérios clínicos e laboratoriais, 14 pacientes com idades entre 3 e 50 anos, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com história de doença hemolítica própria e/ou de seus familiares, que apresentavam uma ou mais das seguintes características: elevados níveis sorológicos de bilirrubina indireta, presença de eritroblastos no sangue periférico, reticulocitose, fragilidade osmótica alterada e anemia. O grupo controle foi constituído por 20 voluntários considerados saudáveis, com idades entre 20 e 50 anos.

As amostras de sangue venoso foram coletadas em citrato-fosfato-dextrose (CPD), (Erslev, 1995), e as membranas isoladas segundo (Dodge *et al.*, 1963), como segue: os eritrócitos foram lavados três vezes em NaCl 155mM, a 4°C. (centrífuga Sorvall RC2B). O sedimento foi diluído a 1:40 em tampão fosfato 5mM contendo fluoreto de fenil metil sulfonil (PMFS) 200mM em etanol, como inibidor de proteases. Os eritrócitos foram lisados por agitação enérgica e centrifugados a 12000 x g a 4°C durante 10 min, lavando-se o estroma várias vezes até se obter sedimento de cor branca opaca. A concentração das proteínas de membrana foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). O sedimento final foi solubilizado com solução de Laemmli (1970) na proporção de 2:1, fracionado em pequenas alíquotas e congelado a -20°C.

As membranas eritrocitárias foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida)dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A confecção das placas de gel foi realizada em um molde formado por duas placas de vidro e separadores de acrílico. O molde foi preenchido até 1 cm da borda superior com solução de acrilamida a 12% (gel de corrida) e após a polimerização, completado com acrilamida a 4% (gel de alinhamento), no qual foram moldadas cavidades para aplicação de amostras de 100 mg de proteína. A corrida eletroforética foi de 18 h, em cuba vertical de acrílico (Permatron) contendo tampão Tris Glicina 50mM, pH 8,3, sob tensão de 25 volts e corrente de 15mA (Laurent, 1963; Davis, 1962; Weber, 1975; Sauberman, 1979). As placas de gel foram coradas com Coomassie Blue (Brilliant Blue R Sigma B 0630), 1 g; ácido acético glacial, 200 ml; álcool isopropílico, 300 ml; água bidestilada, 1.300ml durante 1 h em

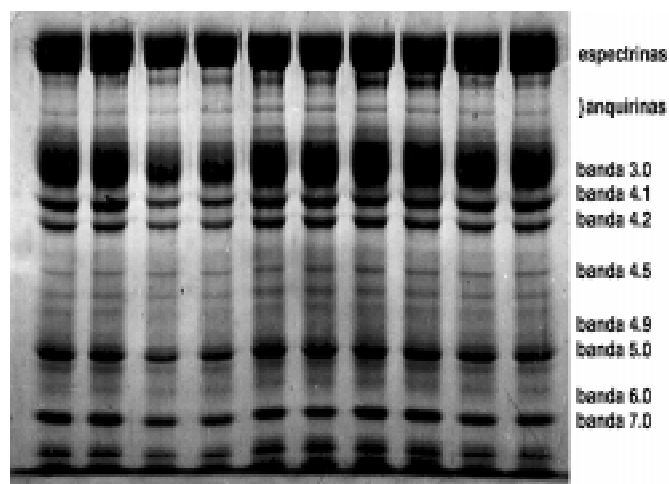


FIG 1 - Eletroforese em gel de poli(acrilamida)dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) Fotografia de eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária segundo Laemmli (1970). As membranas foram isoladas pelo método de Dodge *et al.* (1963) a partir do sangue de indivíduos do grupo controle.

estufa a 56°C, descoradas em ácido acético a 10% (v/v), e conservadas em água destilada e as bandas protéicas, quantificadas por densitometria (Zênite Z-30 Turbo).

Os resultados obtidos foram comparados aos do grupo controle (teste t, nível de significância de 5%).

RESULTADOS

A Figura 1 apresenta a eletroforese em gel de poli(acrilamida), realizada com as membranas eritrocitárias de indivíduos do grupo controle. Os valores de referência das frações protéicas obtidos foram (%; n = 10): espectrinas = 29,67 ± 4,14; anquirinas = 3,97 ± 1,84; banda 3 = 38,70 ± 4,96; banda 4.1 = 6,79 ± 1,60; banda 4.2 = 5,00 ± 1,43; banda 4.5 = 1,89 ± 0,96; banda 4.9 = 1,83 ± 1,22; banda 5 = 6,54 ± 3,13; banda 6.0 = 2,70 ± 1,24; banda 7.0 = 2,36 ± 1,33. Os valores médios para os portadores de esferocitose foram 24,4% para espectrina e 35,8% para banda 3 (teste t; p<0,05).

A Tabela I apresenta as alterações quantitativas, caracterizadas por aumento ou diminuição em relação ao controle, para cada fração protéica da membrana eritrocitária, nos eritrócitos dos pacientes estudados.

As Figuras 2 e 3 apresentam fotomicrografias eletrônicas de varredura dos eritrócitos de pacientes com diagnósticos presuntivos de HE e de HS, respectivamente.

DISCUSSÃO

A eletroforese de proteínas de membrana em gel de poli(acrilamida) tem sido indicada para o diagnóstico de doenças hemolíticas por defeito de membrana (Laemmli, 1970; Agre *et al.*, 1985; Silveira, 1992).

As alterações da morfologia eritrocitária observadas foram bastante variáveis. A presença de esferócitos na maioria dos pacientes com deficiência de espectrina e/ou de proteína 3 sugere uma possível relação com a HS. Diversos autores propõem que a formação dos esferócitos está relacionada com a perda de lipídios e/ou proteí-

TABELA I
SDS-Page de proteínas de membrana de eritrócitos de portadores de esferocitose (HS) e eliptocitose hereditária (HE). Variações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle

	Frações protéicas									
	1.0	2.1	3.0	4.1	4.2	4.5	4.9	5.0	6.0	7.0
1	+	+	-	+	0	+	0	-	-	-
2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
3	0	+	-	-	-	+	+	-	0	+
4	0	+	+	+	0	-	-	-	-	-
5	-	0	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	0	0	+	+
8	-	0	0	+	+	+	+	-	+	+
9	-	+	0	+	0	0	+	-	-	-
10	-	+	-	0	-	+	+	0	+	+
11	-	+	-	+	-	+	+	0	-	0
12	+	+	0	+	0	-	-	-	-	-
13	-	+	-	+	0	+	+	0	+	+
14	-	+	-	+	-	+	+	0	+	+

0 igual ao controle, + superior ao controle, - inferior ao controle (teste t; significância estatística a nível de 5%); HS - portadores 1 a 12; HE - portadores 13-14.

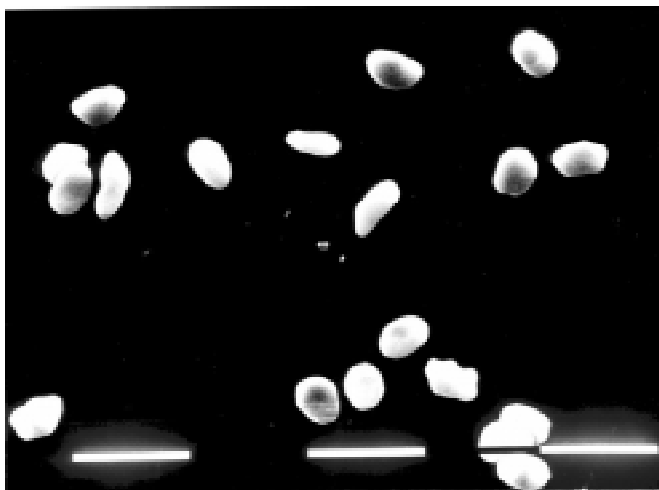


FIG. 2 - *Eliptócitos* - Eritrócitos de portadora de eliptocitose hereditária (MEV 2000 X).

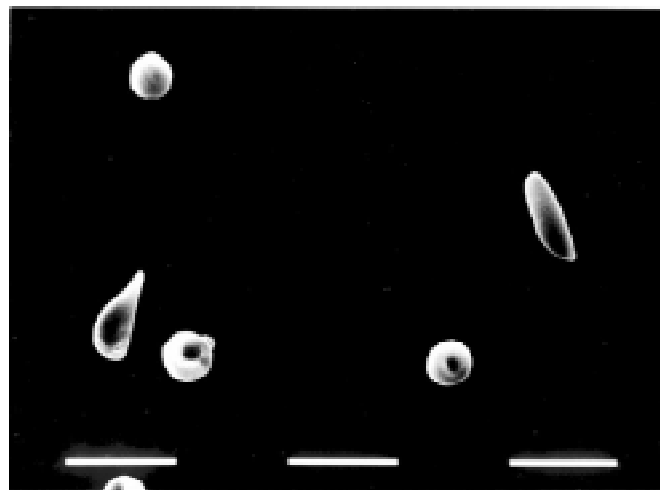


FIG. 3 - *Dacriócitos e esferócitos* - Eritrócitos de portador de esferocitose (MEV 2000 X).

nas de membrana, na forma de microvesículas (Rumsby *et al.*, 1977; Shukla *et al.*, 1978; Chasis *et al.*, 1988). Outra hipótese sugerida para a formação de esferócitos afirma que uma deficiência de proteína 3 pode deixar espaços vazios na bicamada lipídica, levando a um desacoplamento das unidades do citoesqueleto protéico, liberando lipídios da membrana em forma de microvesículas (Jarolim *et al.*, 1994). Um terceiro mecanismo estaria relacionado com o enfraquecimento da ligação da proteína 3 com as proteínas do citoesqueleto, com perda dessa proteína e dos lipídios que a rodeiam (Jarolim *et al.*, 1994).

Em alguns pacientes, observou-se esferócitos associados à deficiência em espectrina e/ou banda 3 e de proteína 4.1, responsável pela estabilização do complexo junctonal. Uma vez que cada dímero de espectrina se associa a uma molécula de proteína 4.1, a deficiência da primeira poderia acarretar a perda da segunda, aumentando a instabilidade da membrana, com formação de esferócitos (Cohen, 1983). Um dos pacientes apresentou 42% de esferócitos, com apenas 41,5% de proteína 3 em relação ao controle normal. Outro paciente, com 13,6% de esferócitos, apresentou espectrina normal, 91% do normal de proteína 3, 86% de proteína 4.1 e 62% do normal de proteína 4.2, com fragilidade osmótica normal.

Em eliptocitose, quando a eletroforese demonstra valores quantitativos normais, deve-se considerar a possibilidade de alterações apenas funcionais (Ideguchi *et al.*, 1993)

CONCLUSÕES

A análise do perfil eletroforético das proteínas de membrana eritrocitária em portadores de HS e HE, permite concluir que:

a) a SDS-PAGE é útil para o diagnóstico de HS e HE; b) esferócitos ou eliptócitos no sangue periférico, associados à deficiência de espectrina e/ou proteína 3, sugere diagnóstico de HS ou HE, respectivamente;

c) deficiência de espectrina se acompanha, em geral, de deficiência de proteína 3, independentemente do diagnóstico mais provável;

d) devido às várias interações entre as proteínas do citoesqueleto, é possível que a deficiência de uma proteína possa causar a perda de outra proteína;

e) portadores assintomáticos podem ser detectados se apresentarem deficiências de proteínas integrais e/ou do citoesqueleto, associadas a alterações morfológicas de eritrócitos.

REFERÊNCIAS

1. **Agre, P.; Casella, J. F.; Zinkham, W. H.; Mc Millan, C.; Bennett, V.** Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature*. 314:380-383, 1985.
2. **Bennett, V.** Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Meth. Enzymol.* 96:313-324, 1981.
3. **Chasis, J. A.; Agre, P.; Mohandas, N.** Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 82:617-623, 1988.
4. **Cohen, C. M.** The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin. Hematol.* 20:141-158, 1983.
5. **Davis, B. J.** Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2:404-425, 1962.
6. **Dodge, J. T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. J.** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100:119-130, 1963.
7. **Erslev, A. J.** Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In: *Williams Hematology*, 5th ed., New York, Mc Graw-Hill Inc., 1668p, 1995.
8. **Ideguchi, H.; Yamada, Y.; Kondo, S.; Tamuka, K.; Makino, S.; Hama-saki, N.** Abnormal erythrocyte band 4.1 protein in myelodysplastic syndrome with elliptocytosis. *Br. J. Haematol.* v.85, p.387-392, 1993.
9. **Jarolim, P.; Rubin, H. L.; Liu, S. C.; Cho, M. R.; Brabec, V.; Derick, L. H.; Yi, S. J.; Saad, S. T. O.; Alper, S.; Brugnara, C.; Golan, D. E.; Palek, J.** Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 (AE1) gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (Band 3^{Prague}). *J. Clin. Invest.* 93:121-130, 1994.
10. **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
11. **Laurent, T. C.; Killander, J.** A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatol.* 14:317-330, 1964.
12. **Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
13. **Palek, J.; Lux, S.** Red cell membrane skeleton defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin. Hematol.* 20:189-224, 1983.
14. **Rumsby, M. G.; Trotter, J.; Allan, D.; Michell, R. H.** Recovery of membrane micro-vesicles from human erythrocytes stored for transfusion: a mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 5:126-128, 1977.
15. **Sauberman, N.; Fortier, N. L.; Fairbanks, G.; O'Connor, R. J.; Snyder, M.** Red cell membrane in hemolytic disease studies on variables affecting electrophoretic analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 556:292-313, 1979.
16. **Shukla, S. D.; Berriman, J.; Coleman, R.; Finean, J. B.; Michell, R. H.** Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *Febs. Letters.* 90:289-292, 1978.
17. **Silveira, P. A. A.** *Contribuição ao estudo das anemias por defeito protéico da membrana eritrocitária com o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida.* São Paulo, 1992. 94p. [Tese-Doutoramento. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo].
18. **Weber, K.; Osborn, M.** Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: *The Protein*, v.1, 3th ed., Edited by Hans Neurath and Rotberg L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1975.

Endereço para correspondência
 Prof^ª Maria Suely Soares Leonart
 Laboratório de Citologia e Hematologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná - Curitiba, PR
 E-mail: msue@ufpr.br