

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio	135
<i>Rafael Noel Moresco, Luciano da Silva Xavier, Marisa Gutjahr Kayser, Alan Birck & Rejane Pan Becker</i>	
<i>Relationship between cardiac troponins levels T and I in the investigation of myocardial damage</i>	
Artigo de revisão	
Papiloma Vírus Humano	137
<i>Emiliana D.C. da Silva, Rafael Smanioto, Simone F. Campos & Patricia Haas</i>	
<i>Human Papillomavirus: a review</i>	
Padronização de spot tests para uso em laboratórios com atendimento em emergências toxicológicas	143
<i>Carla Brugin Marek, Rafaela dal Piva & Ana Maria Itinose</i>	
<i>Using standardization spot tests in laboratories with toxicological emergencies service</i>	
Diagnóstico e prevenção de parasitoses no reassentamento São Francisco em Cascavel - PR	145
<i>Juliana Ribeiro Ferreira, Fernanda Volpato, Fabio Martinez Carricondo, Juliana Curi Martinichen & Veridiana Lenartovicz</i>	
<i>Diagnosis and parasitosis prevention at São Francisco replacement, Cascavel - PR</i>	
Giardiase em creches do município de Maringá, PR	147
<i>Aurea Regina Telles Pupulin, Mônica Lúcia Gomes, Maria Luiza G. G. Dias, Silvana Marques de Araújo, Ana Lucia Falavigna Guilherme & João Balduino Kuhl</i>	
<i>Giardiasis in daycare centers at Maringá, PR</i>	
Doença de Chagas em crianças no Estado do Paraná, Brasil	151
<i>Silvana Marques de Araújo, Mônica Lúcia Gomes, Mario Ortiz, Arnaldo Lima Costa, Umberto Assis Membrive, Max Jean de Ornelas Toledo & Ana Lucia Falavigna Guilherme</i>	
<i>Chagas' disease in children from Paraná State, Brazil</i>	
Programa de Controle da Qualidade externo em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e Região Metropolitana, PR	155
<i>Aline Borsato Hauser, Caroline Luise Prochaska, Aguiinaldo José do Nascimento & Maria Suely Soares Leonart</i>	
<i>External Quality Control Program in hematology: interlaboratory variability for red blood cell and platelets values in Curitiba and Metropolitan Area, PR., Brazil</i>	
Uso do método de cultura semi-quantitativa para estudo de bacteremia relacionada ao cateter venoso central utilizado por pacientes em hemodiálise	159
<i>Elisabeth Eyko Aoki, Lourdes Botelho Garcia, Antonio Carlos Pizzolito & Elisabeth Loshchagin Pizzolito</i>	
<i>Use of semiquantitative culture method to study bacteremia with central venous catheter related in hemodialysis patients</i>	
Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário?	163
<i>Beatriz Schlatter Hasenack, Audrey de Souza Marquez, Eryka Helena Trapp e Pinheiro, Rosiley Lima Guilherme, Fernanda Tito Frasson & Gisele de Souza Avelar</i>	
<i>Dysuria and polaciuria: really a suggestive symptom of urinary tract infection?</i>	
Cultura de células primordiais de medula óssea tipo Dexter: um procedimento laboratorial que mimetiza a hematopoese	167
<i>Almeriane Maria Welfort-Santos, Ph.D. & Marco Antonio Bittencourt</i>	
<i>Dexter long-term bone marrow culture: a laboratorial procedure that mimics hemopoiesis</i>	
Epidemiologia das infecções bacterianas e fúngicas diagnosticada através de hemocultivos, no Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM, RS	173
<i>Bettina H. Meneghetti, Adenilde Salla, Nara Lucia Dal Forno, Loiva T. Oliveira, Roselene Righi & Sydney Hartz Alves</i>	
<i>Bacterial and fungi infections epidemiology diagnosed by blood culture in Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM, RS, Brazil</i>	
Avaliação da sensibilidade e especificidade da metodologia de enzimaímunoensaio com microparticulas para a dosagem de ferritinas	177
<i>S. Lunedo, R. Pontarolo & M.E.M. Rocha</i>	
<i>Sensibility and specificity evaluation of microparticle enzyme immunoassay method for ferritin measurement</i>	
Quantificação da ploidia de DNA em neoplasias intra-epiteliais e invasivas do epitélio escamoso do colo uterino, utilizando sistema de análise computadorizado de imagens - estudo de casos em Recife - PE	181
<i>Ana Maria de Ataides Romaguera, Carlos Eduardo de Queiroz Lima, Diógenes Luis da Mota, Alexandre Motta Bittencourt, Jean Batista de Sá, Alexandre S. Casimiro Onofre & Alex Benicio da Silveira</i>	
<i>DNA ploidy quantification in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma by computer image analyse in cases of Recife - PE</i>	
Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas	183
<i>Shirley Ramos da Rosa Utiyama, Iara Taborda de Messias Reason & Lorete Maria da Silva Kotze</i>	
<i>Recent concepts in the activation of complement system and biological properties</i>	

3

VOLUME 36

2004

Associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio

Relationship between cardiac troponins levels T and I in the investigation of myocardial damage

Rafael Noal Moresco¹, Luciano da Silva Xavier², Marisa Gutjahr Kayser², Alan Birck³ & Rejane Pan Becker²

RESUMO – O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocasiona o rompimento da membrana das células cardíacas, ocorrendo a liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular. Os marcadores bioquímicos tradicionais desempenham um papel limitado no diagnóstico do IAM, sendo que a mensuração dos níveis séricos das troponinas cardíacas T (cTnT) e I (cTnI) tem contribuído para o correto diagnóstico do IAM. Este estudo tem por objetivo avaliar o grau de associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio. Foram utilizadas 62 amostras de sangue provenientes de pacientes com suspeita clínica de apresentarem lesões do miocárdio para a mensuração da cTnT (Troponin T STAT, Roche Elecsys) e cTnI (Turbo Troponin I, DPC Immulite). Todos os pacientes incluídos no grupo 1 apresentaram os níveis de cTnT <0,01ng/mL e cTnI <0,5. A média e o erro padrão dos níveis séricos de cTnT e cTnI foram $1,06 \pm 0,24$ ng/mL e $12,22 \pm 3,96$ ng/mL, respectivamente. Foi observada uma associação significativa entre os níveis de cTnT e cTnI no grupo 2. Os níveis séricos de cTnT e cTnI estão diretamente associados em ambas técnicas descritas neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE – Lesões do miocárdio, troponina T, troponina I.

SUMMARY – Acute myocardial infarction (AMI) disrupts cardiac cell membranes, releasing intracellular cardiac proteins into the vascular system. Traditional biochemical markers play a limited role in the diagnosis of AMI and the measurement of serum cardiac troponin T (cTnT) and I (cTnI) levels has contributing to correct diagnosis of AMI. The aim of this study was to evaluate the association between serum cTnT and cTnI levels. In this study 62 blood samples from patients with suspected of myocardial damage were tested using cardiac troponin T (Troponin T STAT, Roche Elecsys) and cardiac troponin I (Turbo Troponin I, DPC Immulite) immunoassays. All patients included in the group 1 showed cTnT levels <0.01ng/mL and cTnI levels <0.5ng/mL. The mean and standard error of serum cTnT and cTnI levels in the group 2 were 1.06 ± 0.24 ng/mL and 12.22 ± 3.96 ng/mL, respectively. It was observed a significant association between cTnT and cTnI levels in the group 2. The serum cTnT and cTnI levels are directly associated in both techniques described in this study.

KEYWORDS – Myocardial damage, cardiac troponin T, cardiac troponin I.

INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocasiona o rompimento da membrana das células cardíacas, ocorrendo a liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular. Algumas destas proteínas, incluindo a mioglobina, creatina quinase fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) tipo 1 e as troponinas cardíacas T e I têm contribuído para o diagnóstico do IAM.¹ Em muitos pacientes apresentando dor torácica, o diagnóstico correto das lesões do miocárdio depende principalmente dos marcadores cardíacos, uma vez que o eletrocardiograma frequentemente não é diagnóstico.² Os marcadores bioquímicos tradicionais, incluindo a creatina quinase (CK), CK-MB, LDH e aspartato aminotransferase (AST), desempenham um papel limitado do diagnóstico do IAM em função de suas especificidade e sensibilidade insatisfatórias.³

O desenvolvimento de métodos capazes de mensurar proteínas estruturais, principalmente as troponinas T e I, constituem uma ruptura com o passado em termos de diagnóstico. Como estas proteínas são realmente cardio-específicas, o seu aparecimento e consequente elevação de seus níveis séricos podem ser considerados sinais de lesões no miocárdio.³ A mensuração dos níveis séricos das troponinas cardíacas T (cTnT) e I (cTnI) tem contribuído para o correto diagnóstico do IAM, já que estes são considerados sensíveis e especí-

ficos marcadores para a avaliação das lesões do miocárdio.^{2,9}

Embora cTnT e cTnI sejam consideradas marcadores seguros para a avaliação dos danos do miocárdio, alguns autores sugerem que, durante o dano cardíaco, a cTnI é a proteína inicialmente liberada no sangue, demonstrando, desta forma, ser um marcador melhor do que a cTnT.⁷ Entretanto, outros autores atribuem à cTnI e à cTnT a mesma especificidade e importância na avaliação dos danos cardíacos.^{2,3} Considerando algumas divergências encontradas na literatura sobre a importância das troponinas cardíacas, este trabalho tem por objetivo avaliar o grau de associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizadas 62 amostras de sangue provenientes de pacientes com suspeita clínica de apresentarem lesões do miocárdio para a mensuração dos níveis de cTnT e cTnI. As amostras de sangue foram colhidas pela técnica padrão de punção venosa, sendo transferidas para tubos à vácuo sem anticoagulante. O soro foi obtido após centrifugação por 10 minutos a 2800g. As amostras foram analisadas simultaneamente utilizando os imunoensaios para a mensuração da cTnT (Elecsys 2010, Roche Diagnostics) e cTnI (Immulite, DPC). Os pacientes foram

Recebido em 20/1/2004
Aprovado em 02/8/2004

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ²Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; ³Departamento de Assessoria Científica, Unidade de Apoio à Pesquisa, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

incluídos em dois grupos de acordo como os níveis de troponinas obtidos. Este protocolo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Os níveis séricos de cTnT foram mensurados com a utilização de um imunoenensaio eletroquimioluminescente quantitativo (Troponin T STAT, Roche) no analisador automatizado Roche Elecsys 2010. A amostra, um anticorpo monoclonal biotilado troponina T-específico e um anticorpo monoclonal troponina T-específico marcado com rutênio reagem entre si formando um complexo. Após a adição de micropartículas revestidas com estreptavidina, o complexo formado fixa-se à fase sólida através da interação da biotina e da estreptavidina. Esse complexo é aspirado para a célula de leitura onde as micropartículas são magneticamente capturadas pela superfície do eletrodo. As substâncias livres são então removidas. É aplicada uma voltagem sobre o eletrodo para que ocorra uma emissão quimioluminescente, a qual é mensurada por um fotomultímetro. Os resultados são determinados a partir de uma curva de calibração. O limite mínimo de detecção deste ensaio é 0,01ng/mL (faixa de 0,01-25ng/mL). Os valores de cTnT esperados para indivíduos saudáveis são inferiores a 0,01ng/mL.

Os níveis séricos de cTnI foram determinados com a utilização de um ensaio quimioluminescente (Turbo Troponin I, DPC) no analisador DPC Immulite. Este kit é composto por unidades individuais de reação rotulada com código de barras contendo uma pérola revestida com anticorpo monoclonal anti-Troponina I. O reagente é constituído por fosfatase alcalina conjugada com anticorpos anti-Troponina I no tampão. A revelação da reação ocorre com a utilização de um substrato quimioluminescente, sendo que a sua hidrólise pela fosfatase alcalina resulta na emissão de fótons que são convertidos para concentração de cTnI a partir de uma curva de calibração. Os limites de detecção deste ensaio variam entre 0,5-100ng/mL. Os valores esperados para indivíduos saudáveis devem ser inferiores a 1,0ng/mL.

Os níveis de cTnT e cTnI estão apresentados como valores médios obtidos nos respectivos grupos. Foi realizada análise por regressão linear para avaliar o grau de associação entre os níveis de cTnT e cTnI obtidos nos pacientes incluídos no grupo 2, sendo considerado $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Todos os pacientes incluídos no grupo 1 apresentaram cTnI $< 0,5$ ng/mL e cTnT $< 0,01$, conforme demonstrado na Tab. I. A média e o erro padrão dos níveis séricos de cTnI e cTnT foram $12,22 \pm 3,96$ ng/mL e $1,06 \pm 0,24$ ng/mL, respectivamente. Também foi observada uma forte associação entre os níveis de cTnI e cTnT nos pacientes avaliados no grupo 2 ($r = 0,9033$, $P < 0,001$), conforme apresentado na Fig. 1.

TABELA I
Níveis séricos de cTnT e cTnI obtidos nos grupos avaliados

Grupo	cTnT (ng/mL)	cTnI (ng/mL)
1 (n=37)	<0.01	<0.5
2 (n=25)	$1,06 \pm 0,24$	$12,22 \pm 3,96$

Os resultados de cTnT e cTnI no grupo 2 estão expressos em média \pm erro padrão.

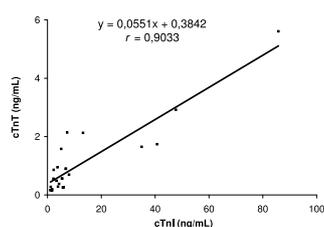


FIG. 1 - Associação entre os níveis séricos de cTnT e cTnI dos pacientes avaliados no grupo 2 ($r = 0,9033$, $P < 0,001$).

DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou uma associação significativa entre os níveis séricos de cTnI e cTnT nos pacientes incluídos neste trabalho. Foi relatado que valores normais de cTnI estão diretamente associados a valores normais de cTnT, sendo que, em situações onde há uma elevação nos níveis de cTnI, também ocorre o aumento dos níveis de cTnT. Os níveis séricos de cTnI e cTnT fornecem importante informação para o diagnóstico de lesões do miocárdio em várias condições, incluindo infarto do miocárdio, miocardite aguda, necrose do miocárdio induzida por isoproterenol, entre outras.¹⁰ Mullen *et al.* recentemente avaliaram se a cTnI e/ou cTnT poderiam ser considerados marcadores úteis para a avaliação de rejeição após o transplante cardíaco, sendo demonstrado que elas não constituem parâmetros úteis para prever a rejeição do transplante cardíaco.⁷

As troponinas cardíacas são liberadas após a necrose do miocárdio e são detectadas no sangue em média após 4-6 horas do início do infarto, com pico observado entre 16-18 horas, permanecendo com níveis acima do normal por pelo menos 7 dias.⁴ Ambas cTnI e cTnT são úteis para o diagnóstico de doenças cardíacas, fornecendo importante informação prognóstica. Metzler *et al.* recentemente relataram a evidência de que a cTnT pode servir como parâmetro para estimar a extensão do infarto.¹¹ Bertinchant *et al.* demonstraram uma associação significativa entre o nível sérico máximo de cTnT e a extensão das alterações morfológicas do miocárdio em modelo experimental utilizando ratos. A cTnT demonstrou grande capacidade para detectar os menores danos no miocárdio induzidos por doxorubicina em comparação com outros marcadores, incluindo cTnI, CK-MB massa e CK.¹⁰

Os níveis séricos de cTnI e cTnT mensurados por quimioluminescência e eletroquimioluminescência, respectivamente, estão diretamente associados em ambas técnicas. As troponinas cardíacas I e T vêm sendo definidas como marcadores sensíveis e específicos para a avaliação das menores lesões do miocárdio e elas desempenham um papel definitivo no diagnóstico e monitoramento de doenças cardíacas.

REFERÊNCIAS

1. Le Moigne, F.; Beauviex, M.C.; Derache, P.; Darmon, Y.M. Determination of myoglobin: comparative evaluation of the new automated VIDAS assay with two other immunoassays. *Clin Biochem.* 35:255-62, 2002.
2. Penttilä, K.; Koukkunen, H.; Kemppainen, A.; *et al.* Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. *Int J Clin Lab Res.* 29:93-101, 1999.
3. Plebani, M.; Zaninotto, M. Cardiac markers: present and future. *Int J Clin Lab Res.* 29:56-63, 1999.
4. Sarko, J.; Pollack, C.V. Cardiac troponins. *J Emerg Med.* 23:57-65, 2002.
5. Speth, M.; Seibold, K.; Katz, N. Interaction between heparin and cardiac troponin T and troponin I from patients after coronary bypass surgery. *Clin Biochem.* 35:355-362, 2002.
6. Christenson, R.H.; Azzazy, H.M.E. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 44:1855-64, 1998.
7. Mullen, J.C.; Bentley, M.J.; Scherr, K.D.; *et al.* Troponin T and I are not reliable markers of cardiac transplant rejection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 22:233-37, 2002.
8. Apple, F.S.; Falahati, A.; Paulsen, P.R.; Miller, E.A.; Sharkey, S.W. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem.* 43:2047-51, 1997.
9. Katus, H.A.; Looser, S.; Hallermayer, K.; *et al.* Development and *in vitro* characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem.* 38:386-93, 1992.
10. Bertinchant, J.P.; Polge, A.; Juan, J.M.; *et al.* Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta.* 329:39-51, 2003.
11. Metzler, B.; Hammerer-Lercher, A.; Jehle, J.; *et al.* Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 325:87-90, 2002.

Endereço para correspondência

Rafael Noal Moresco,

Rua Marquês do Maricá 494, Vila Nova, Porto Alegre, RS, 91750-460, Brasil.

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Papiloma Vírus Humano

Human Papillomavirus: a review

Emiliana D.C. da Silva¹, Rafaela Smanioto¹, Simone F. Campos¹ & Patrícia Haas²

RESUMO – O Papiloma Vírus Humano (HPV) vem sendo intensamente pesquisado e estudado em virtude da sua grande ocorrência na população mundial e da íntima relação com a carcinogênese cervical. Aproximadamente 100 tipos de HPV já foram identificados e destes cerca de 1/3 estão associados a infecções genitais transmitidas sexualmente. O diagnóstico da infecção pode ser clínico e/ou laboratorial partindo da observação das lesões que podem apresentar-se de forma clínica, subclínica ou latente. Porém, ainda hoje não há evidências de que os tratamentos disponíveis erradiquem ou afetem a história da infecção natural do HPV. Enquanto vacinas e uma terapia eficaz contra a papilomavirose está sendo desenvolvida e testada, a profilaxia parece ser a forma mais adequada para evitar a transmissão e a disseminação da doença.

PALAVRAS-CHAVE – Papiloma Vírus Humano (HPV), condiloma, câncer, infecção genital.

SUMMARY – *The Human Papillomavirus, HPV, has been hardly researched and studied in consequence of its highly expressive occurrence on the world population and its intim relation with cervical cancer. About 100 kinds of HPV have already been identified and about 1/3 of them are associated with sexually genital infections transmitted. Infection's diagnosis can be clinic and/or laboratorial in according with the lesions observations being clinical, sub clinical or latent form, howere there are not evidence yet that the available treatments are efficacious or can change the history of the HPV natural infection. While vaccines and an efficacious therapy against human papillomavirus are been development and tested, the prevention seems the most adequate form to avoid the disease transmission and dissemination.*

KEYWORDS – Human Papillomavirus (HPV), warts, cancer, genital infection.

INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é a mais comum virose de transmissão sexual. A partir dos anos 80 transformou-se em um expressivo problema pela íntima relação com lesões genitais malignas e seus precursores. Em pouco mais de duas décadas, os estudos e pesquisas permitiram acumular grande volume de conhecimento sobre a estrutura e organização genética do HPV, os métodos de diagnóstico e de detecção viral, o tratamento e a relação com o câncer. A papilomavirose pode ocorrer em diferentes partes do organismo. Alguns tipos de HPV afetam as mãos, joelhos e pés, outros a face e ainda o trato genital. As formas clínicas e os aspectos morfológicos dos diferentes papilomas, ou condilomas, são característicos e vão de verrugas plantares e dolorosas, papilomas orais e laríngeos, condilomas acuminados planos e invertidos. Aproximadamente 100 tipos virais de HPV já foram identificados e cerca de 1/3 destes, estão associados a infecções genitais transmitidas sexualmente (Koutsky & Kiviat, 1999).

A área genital pode ser infectada por mais de 20 tipos e subtipos distintos de HPV, entre eles, os chamados de baixo risco porque são encontrados de forma não integrada ao interior do genoma da célula hospedeira e aqueles catalogados como de alto risco, por estarem relacionados com a oncogênese genital, estando os virions integrados ao genoma de célula hospedeira. O tipo de HPV parece ter importância na localização anatômica, na aparência clínica e na história e evolução natural das lesões.

Dependendo do status imunológico do hospedeiro o mesmo tipo de HPV poderá determinar lesões benignas como verrugas e displasias leves, ou malignas como displasias moderadas, acentuadas, carcinomas *in situ*, invasores e metastáticos genitais. Os tipos de vírus do papiloma são identificados pelo grau de similitude de seus DNAs. A homologia dos novos tipos de HPV varia de 45% a 90%, isto é, dois tipos viróticos distintos apresentam obrigatoriamente menos de 50% de homologia. Os HPVs com mais de 50%, porém menos de 90% são classificados como subtipos. Os virions analisados à luz da microscopia eletrônica apresentam um capsídeo de forma icosaédrica, composto por 72 capsômeros. A proteína *major* L1, mais importante do capsídeo, tem peso molecular de 54.000 daltons. Esta proteína, desnaturada, apresenta reação cruzada antígenoicamente. Isto tem uso clínico e serve de base para os estudos imunoquímicos. A proteína *minor* L2 tem peso molecular de 76.000 daltons. No entanto, por estar bastante protegida no interior do capsídeo intacto, não serviria de base para uma possível vacina. O cromossomo do HPV possui uma molécula de DNA de dupla fita, circular e fechada covalentemente. Estudos das seqüências de DNA revelam que ele pode apresentar-se de forma integrada ou não ao DNA da célula hospedeira. A integração ocorre em um ou mais sítios do DNA celular, freqüentemente próximos a um proto-oncogen. Certas proteínas presentes no interior dos virions são capazes de eliminar a repressão sobre os proto-oncogenes, transformá-lo em oncogen e promovendo a anarquia celular, determinar as graves lesões epiteliais (Passos, 1995; Jacyntho *et al.*, 1996).

Recebido em 02/1/2003

Aprovado em 19/2/2003

¹Acadêmicas do Curso de Farmácia Habilitação em Análises Clínicas – UFSC; ²Profª do Deptº de Análises Clínicas – UFSC

A transmissão se dá através do contato direto epitélio-epitélio vaginal, oral ou anal. O vírus também pode ser transmitido pela mão e durante o nascimento. Esta forma de transmissão "vertical", mais raramente, encontra-se associada ao desenvolvimento de papilomas laríngeos em crianças, cerca de 2 a cada 4 milhões. Algumas pesquisas sugerem a transmissão via fômites (objetos inanimados como toalhas ou roupas íntimas), porém mais pesquisas precisam ser feitas para afirmar este modo de transmissão com exatidão (McDermott-Webster, 1999; Jay & Moscicki, 2000; Stevens-Simom *et al.*, 2000).

O período de incubação é bastante variável podendo estar intimamente relacionado com a competência imunológica individual. O grau de infectividade das verrugas genitais é de aproximadamente 60% e parece decrescer no decorrer do tempo. Relatou-se que não estava totalmente claro se o grau de infectividade dependia da idade das lesões ou da quantidade de vírus infectante. Como o contato sexual não produz verrugas genitais em todos os casos, parece não haver dúvida da presença de algum grau de resistência individual representado por um fator endógeno (imunidade celular) ou fatores locais influenciando na transmissão da enfermidade (Passos, 1995).

O grau de contágio parece ser relativamente alto, onde 25 a 65% dos indivíduos contaminam-se após contato sexual com parceiros infectados. As lesões podem, ainda, ser facilmente disseminadas para regiões circunvizinhas, através do processo de auto-inoculação. O HPV penetra no epitélio a partir das células basais e parabasais. Estas, cujo núcleo contém o DNA virótico, são células não permissivas, isto é, não permitem a multiplicação virótica. Talvez seja necessário microtraumatismos no epitélio para possibilitar o acesso direto das partículas virais até as camadas mais profundas. O conseqüente processo cicatricial, devido ao crescimento de capilares e da acelerada multiplicação celular, contribui para a instalação da infecção. A persistência do DNA virótico estimula a multiplicação do DNA celular e induz a mudanças características de acordo com o tipo de vírus. A multiplicação celular impede a replicação autônoma do vírus. Seguindo o processo fisiológico de maturação, as células migram para a superfície epitelial sofrendo queratinização. Assim, não mais se multiplicam permitindo a multiplicação independente do DNA viral e formação de *virions* completos. As células maduras queratinizadas contêm grande quantidade de *virions* que, liberados durante a escamação celular, infectam as células vizinhas finalizando o ciclo virótico vital e estabelecendo o processo infeccioso clássico, com lesão condilomatosa típica e seus estigmas colpo-cito-histológicos. Por ação de mutágenos diversos (genéticos, infecciosos, químicos, imunológicos) ou, talvez, de nova infecção pelo HPV, a integração do genoma virótico na célula imatura infectada pode traduzir-se por alteração da função celular. As sínteses proteicas são modificadas ou desaparecem enquanto outras sínteses anormais aparecem, explicando a perda da diferenciação e maturação celular, induzindo à mitose anárquica (Passos, 1995; Jacyntho *et al.*, 1996).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo principal fazer uma revisão bibliográfica sobre o Papiloma Virus Humano (HPV), um vírus que acomete uma boa parte da população e que merece um esclarecimento maior devido ao mal que ele pode causar com um agravamento das lesões geradas.

Epidemiologia

Nos últimos anos observou-se uma verdadeira epi-

demia com a descoberta das lesões sub-clínicas pelo HPV e sua associação com a chamada "revolução sexual" do final do século XX. As infecções vêm aumentando significativamente no mundo ocidental, sendo a infecção condilomatosa do colo do útero, atualmente, a causa mais freqüente de alterações citológicas encontradas no exame preventivo. Estima-se que lesões por HPV representem 50% das atipias cervicais triadas nos esfregaços sistemáticos.

No Brasil, os dados estatísticos são escassos e não traduzem com certeza a verdadeira magnitude da infecção induzida pelo HPV, todavia, ratificam a tendência mundial do avanço da virose. A forma carcinomatosa não aparece, senão tardiamente e seria favorecida por fatores tais como, infecções viróticas ou bacterianas associadas, tóxicos, fumo, álcool, multiplicidade de parceiros, precocidade sexual e freqüência coital (Passos, 1995).

Embora normalmente não haja cura para a infecção genital por HPV, muitos casos são transitórios e desaparecem sozinhos, sem intervenção médica (Elfgrer, *et al.*, 2000; CDC, 2001).

Em um estudo destinado a determinar a história natural do HPV observou-se por 3 anos mulheres adultas jovens utilizando um teste de DNA que detecta pequenas quantidades do HPV, mesmo quando os sintomas não estão presentes. Enquanto 43% das mulheres apresentaram testes positivos ao longo do período estudado, o período médio de duração da infecção foi de 8 meses. Repetindo o teste de DNA verificou-se que em 70% das mulheres houve regressão da infecção e que apenas 9% mantiveram-se infectadas (Passos, 1995; HO, *et al.*, 1998).

O HPV parece ser necessário mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Além do tipo de HPV vários fatores podem contribuir para a evolução carcinomatosa. Foi observado que freiras e virgens não apresentam desenvolvimento de câncer cervical e que mulheres de homens que viajam regularmente ou que estiveram previamente com mulheres portadoras de câncer são mais suscetíveis ao aparecimento do carcinoma ("The Cervical Cancer Virus", 1995; CDC, 1999; Anttila *et al.*, 2000).

Mais recentemente, com o desenvolvimento da técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR), descobriu-se que as infecções pelo HPV podem ser muito mais comuns, atingindo desde portadoras assintomáticas até pacientes com câncer cervical invasivo. A prevalência de DNA-HPV em geral, considerando diferentes populações femininas do mundo, tem variado entre 30 e 50%, segundo a técnica de PCR.

No Brasil, alguns estudos utilizando a técnica de PCR, encontraram diferentes taxas de prevalência em populações variadas. Em estudo de caso-controle realizado em São Paulo observou-se a presença de 17% de DNA-HPV no grupo controle e de 84% no grupo com câncer de colo uterino (Okada, 2000).

Em todo mundo aproximadamente 400.000 novos casos são diagnosticados a cada ano, sendo a média de idade para o aparecimento do câncer cervical, para todas as raças, de 48 anos (Koutsky & Kiviat, 1999; NCI, 1999).

Americanos são usualmente infectados com HPV através da transmissão sexual e estima-se que 75% das mulheres em idade fértil e homens foram infectados com o vírus em alguma etapa das suas vidas. Os maiores índices de infecção genital por HPV são revelados em adultos entre as idades de 18 e 28 anos. A papilomavirose também prevalece em pessoas com desordens imunossupressivas como HIV e transplantados (Koutsky, 1997; Cates, 1999; Koutsky & Kiviat, 1999).

Atualmente, certos tipos de HPV têm sido estabele-

cidos como agentes causadores do desenvolvimento de células alteradas, precursoras de carcinomas. Em um estudo internacional observou-se a presença do HPV em 93% dos tumores cervicais. O HPV 16 foi observado em 50% dos casos; HPV 18 em 14%; HPV 45 em 8%; HPV 31 em 5% e outros tipos de HPV em 23% dos casos (ACOG, 2000; Janieck & Averetle, 2001).

Mesmo o HPV sendo considerado uma das causas do câncer cervical, somente 1 a cada 1.000 mulheres com HPV desenvolvem carcinoma do tipo invasivo. Muitas infecções por HPV nunca chegam a desenvolver o câncer, mesmo sem a intervenção médica ou com o tratamento de neoplasias detectadas pelo teste de Papanicolau, dificilmente haverá a formação do carcinoma invasivo (HO *et al.*, 1998; NCI, 1999; ACOG, 2000).

Diagnóstico

Atualmente está bem clara a associação entre as infecções por HPV e a carcinogênese cervical. Por este motivo, é de grande importância a detecção precoce do HPV para que este seja bem controlado (Kurman e Solomon, 1997; Geneva, 2001; Aids, 2002; Funasa, 2002).

Metade a aproximadamente 3/4 dos cânceres cervicais invasivos contém, seguramente, certos tipos de HPV de "alto risco", ou seja, alguns tipos que estão mais relacionados com o desenvolvimento de cânceres, como os tipos 16, 18, 45 e 56, que acometem as mucosas de acordo com a Tab. I. HPVs de alto risco estão associadas com ambas as lesões de alto e baixo grau, mas são observadas com frequência mais significativa nos grupos das de alto grau (Kurman e Solomon, 1997; Hcanc, 2002).

A progressão tumoral, desde a infecção pelo HPV, está também, sujeita a fatores ambientais, como carcinógenos químicos e físicos, ou restritos aos hospedeiros, tais como hormônios, resposta imune, herança genética, entre outros. A frequência de tumores associados a HPV é maior em pacientes imunodeprimidos, tais como transplantados renais e pacientes aids (Hcanc, 2002).

O diagnóstico pode ser clínico e laboratorial, observando-se as diversas formas de infecção:

- **Infecção clínica:** quando há presença das lesões. Onde podem ser vistos a olho nu observando as chamadas verrugas genitais ou condilomas. O aspecto das lesões é de neofomações sésseis, papilares, múltiplas, com a forma de pequenas cristas, origem do termo vulgar "crista de galo". Podem ser brancas ou hiperocrômicas. Estão mais presentes em áreas úmidas expostas ao atrito durante o coito, ou seja, pequenos lábios e vestibulo vulvar na mulher e prepúcio, glândula e sulco bálano-prepucial no homem, além das regiões anal e perianal de ambos os sexos.

Na forma clínica, as lesões podem ser únicas ou

múltiplas, localizadas ou difusas e de tamanho variável. No homem: glândula, sulco bálano-prepucial e região perianal. Na mulher: vulva, perineo, região perianal, vagina e colo. A biópsia pode ser dispensada nos casos de condilomas acuminados "clássicos" (Aids, 2002; Cervical, 2002; Funasa, 2002).

- **Infecção sub-clínica:** quando as lesões não estão muito visíveis, sendo necessário o diagnóstico através da peniscopia, colpocitologia ("preventivo" ou exame de Papanicolau) e/ou colposcopia com biópsia.

Através do método de Papanicolau o HPV poderá estar presente nos diagnósticos citológicos de LSIL – Lesão intra-epitelial de baixo grau (*Low grade squamous intraepithelial lesion*) ou HSIL – Lesão intra-epitelial de alto grau (*High grade squamous intraepithelial lesion*), de acordo com o sistema Bethesda, 1988. Esta classificação inclui ainda as categorias ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*) e AGUS (*atypical glandular cells of undetermined significance*), em situações em que existem atipias celulares, mas em grau insuficiente para permitir um diagnóstico de lesão intra-epiteliais, nas quais o HPV pode também estar presente.

Como é um meio de diagnóstico indireto e interpretativo, pode apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos. É capaz de diagnosticar uma parcela das formas clínica e sub-clínica, mas não a forma latente da infecção pelo HPV (Aids, 2002; Cervical, 2002; Funasa, 2002).

Para o diagnóstico citológico cérvico-vaginal, deve-se dar preferência para o Sistema Bethesda, o qual foi desenvolvido em dezembro de 1988, com o intuito de garantir uma terminologia uniforme de diagnóstico que facilitaria a comunicação entre o laboratório e o médico.

O Sistema Bethesda foi designado para ser flexível de forma a desenvolver alterações necessárias no "screening" do câncer cervical bem como no avanço no campo da patologia cervical (Kurman e Solomon, 1997; Aids, 2002).

A colpocitologia é o método de triagem para as lesões da vagina e do colo. Para o diagnóstico adequado é necessária a colposcopia com biópsia dirigida das lesões para determinar se existem alterações celulares (Aids, 2002).

No caso das mulheres, as amostras cérvico-uterinas coletadas devem conter células escamosas da zona de transição entre a endocérvice e a ectocérvice, pois cerca de 90% das patologias associadas a HPV no colo de útero localizam-se na transição escamo-columnar do epitélio ou zona de transformação, onde as células proliferativas estão mais expostas (Hcanc, 2002).

- **Infecção latente:** onde não se detecta a lesão. Neste caso, o método de Papanicolau é pouco sensível para detectar as infecções cérvico-uterinas assintomáticas por HPV. Acredita-se que, nesta forma de infecção, o DNA viral encontra-se na forma episomal, aparentemente não funcional e replica-se apenas uma vez a cada ciclo celular, o que seria menos do que o número de cópias virais necessário para o diagnóstico molecular pelos métodos mais antigos como a hibridização *in situ*. Como o vírus não se encontra funcionando nesta forma de infecção, não existem alterações citológicas decorrentes de sua presença. Não são conhecidos os mecanismos pelos quais o HPV permanece neste estado ao invés de estabelecer uma infecção produtiva, na qual seriam observadas as alterações citológicas ou teciduais. Provavelmente, fatores imunológicos são determinantes desta condição (Cervical, 2002; Funasa, 2002).

Nos últimos anos, alguns métodos de detecção do DNA de HPV como a hibridização molecular, a captura híbrida e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

TABELA I
Associação de 15 tipos de HPV às doenças neoplásicas do colo uterino e seus precursores

Classificação em função da associação com lesões graves	Tipos de HPV	Associação com lesões cervicais
Baixo risco	6, 11, 42, 43 e 44	20,2% em NIC de baixo grau, praticamente inexistentes em carcinomas invasores
Risco intermediário	31, 33, 35, 51, 52 e 58	23,8% em NIC de alto grau mas em apenas 10,5% dos carcinomas invasores
Alto risco	16	47,1% em NIC de alto grau ou carcinoma invasor
	18, 45 e 56	6,5% em NIC de alto grau e 26,8% em carcinoma invasor

Fonte: Adaptado de http://www.aids.gov.br/assistencia/mandst99/man_papilomavirus.htm

se (PCR) estão sendo desenvolvidos e implantados em vários laboratórios de pesquisa. Estas técnicas identificam o DNA viral incorporado ou não ao material nuclear da célula infectada e são capazes de identificar os tipos de HPV presentes.

Na análise do DNA ou RNA, os métodos podem ser divididos genericamente em dois grandes grupos:

- os de amplificação do material nucléico (em sua maioria métodos de PCR e seus variantes) e
- os que utilizam amplificação de sinal (nos quais se enquadram os de hibridização, como a captura híbrida e hibridização *in situ*).

Esta distinção é relevante porque os métodos de amplificação de material possuem sensibilidade mais elevada, embora estejam sujeitos a possíveis contaminações de amostras a serem testadas com material amplificado de outras amostras. Isso requer que os laboratórios de diagnóstico sejam equipados com estrutura física adequada e de processamentos bem estruturados para a prevenção e a contínua monitorização de possível contaminação.

Se, por um lado, a microscopia eletrônica é o único método que permite a visualização das partículas virais diretamente, por outro, a hibridização molecular por meio dos diferentes métodos permite a confirmação e classificação do vírus de maneira indireta, tanto nos casos clínicos, como no casos sub-clínicos (Urocontemp, 2002).

No passado, a hibridização tipo *Southern blot* foi amplamente utilizada. A desvantagem deste método é a necessidade de isolar quantidades relativamente grandes e de alta pureza do material genético dos espécimes biológicos, não sendo aplicável ao estudo de tecidos fixados. Mais recentemente, tornou-se conhecida por Captura de Híbridos.

A captura híbrida é um método mais recente que tem a vantagem de utilizar reagentes não radioativos, facilitando seu manuseio e diminuindo seu custo (Haas *et al*, 2000; Cervical, 2002).

Deteção e tipagem do HPV não têm mostrado benefício no diagnóstico e manejo de verrugas genitais externas. Portanto, deteção de rotina e tipagem do HPV não é recomendado correntemente para diagnóstico e tratamento das lesões causadas pelo HPV (Guideline New Zealand, 1999).

Diagnóstico diferencial

Condiloma plano da sífilis (sorologia e pesquisa do *Treponema pallidum* em campo escuro); carcinoma es-

pinocelular do pênis e da vulva e a doença de Bowen (carcinoma *in situ*). Nesses, o diagnóstico diferencial deverá ser apoiado em dados clínicos-patológicos (Aids, 2002; Funasa, 2002).

• **Tratamento:** o objetivo principal do tratamento da infecção pelo HPV é a remoção das verrugas sintomáticas, levando a períodos livres de lesões em muitos pacientes. Verrugas genitais frequentemente são assintomáticas. Nenhuma evidência indica que os tratamentos atualmente disponíveis erradicam ou afetam a história da infecção natural do HPV. A remoção da verruga pode ou não diminuir sua infectividade. Se deixados sem tratamento, os condilomas podem desaparecer, permanecer inalterados, ou aumentar em tamanho ou número. Nenhuma evidência indica que o tratamento do condiloma prevenirá o desenvolvimento de câncer cervical (Sobral, 2002).

O arsenal terapêutico disponível atualmente torna facilmente tratáveis os condilomas genitais, entretanto as constantes recidivas ou persistência das lesões dificultam, prolongam e tornam o tratamento cansativo e desanimador para o paciente e para o médico. Medidas adjuvantes devem ser alertadas, no intuito de melhorar os resultados: ênfase à higiene geral e genital, tratamento das patologias associadas, investigação e tratamento do parceiro e proibição de relações sexuais. Cuidadoso isolamento das áreas vizinhas, com vaselina, por exemplo, deve ser feito para que se evitem lesões dos tecidos sadios (Passos, 1995; Veronesi *et al*, 1996).

Habitualmente, o condiloma acuminado é tratado com aplicação tópica de agentes químicos, como podofilina, ácido tricloroacético (ATA), interferon, 5-fluorouracil (5 FU), interleucina-2 (IL-2) e isoprinosine e através de destruição física por laser de dióxido de carbono (CO₂), crioterapia através de nitrogênio líquido e eletrocauterização. Pode-se fazer uso de imunoterapia com Imiquimod e retinóides assim como outras modalidades de tratamento como homeopatia e acupuntura (Naud, 1993; Passos, 1995; Veronesi *et al*, 1996; Red Book, 1997; Guidelines, 1999; Jorge *et al*, 2000; Carcinoma Colo Utero, 2002; Higgfly, 2002; Medstudents, 2002; Sobral, 2002; Virusonline, 2002).

Nenhum dos tratamentos disponíveis é superior aos outros, e nenhum tratamento será ideal para todos os pacientes nem para todas as verrugas, ou seja, cada caso deverá ser avaliado para a escolha da conduta mais adequada. Pode haver a combinação de mais de um método, os fatores que podem influenciar a escolha do tratamento são o tamanho, número, local e duração da lesão, além de sua morfologia e preferência do paciente, custos, disponibilidade de recursos de conveniência, efeitos adversos, e a experiência do profissional de saúde (Higgfly, 2002; Sobral, 2002; Virusonline, 2002).

A podofilina, usada em concentração de 10 a 25%, é um agente citotóxico, que pode produzir queimaduras graves à pele sadia. Quando em dosagem excessiva, pode determinar efeitos sistêmicos neurotóxicos e nefrotóxicos, sobretudo quando usada em mucosa. Está contra-indicada durante a gestação por haver relatos de abortamento, parto prematuro e morte fetal, além de ação mutagênica. É encontrada no mercado na forma alcoólica, de ação mais rápida e eficaz, porém mais facilmente lesiva à pele e na forma oleosa, de ação mais lenta e potencialmente menos lesiva por fixar-se mais sobre as lesões. A tintura de benjoim também pode ser usada como veículo. Atualmente a aplicação de podofilina em medidas terapêuticas tópicas é a primeira linha no tratamento de verrugas perianais, mas tais terapias, infelizmente, apresentam altas taxas de recorrência (Passos, 1995; Medstudents, 2002).

TABELA II

Equivalência de nomenclaturas citológicas e histológicas das lesões pré-invasivas do câncer cervical uterino

Classificação citológica de Papanicolaou	Classificação Internacional de Doenças (OMS - 1952-1973)	Classificação de Richard (1968)	Classificação citológica pelo Sistema de Bethesda (1989)	Proposta de classificação histológica análoga ao Sistema Bethesda (Richard, 1990)
Classe I	-	-	Normal	-
Classe II	-	-	Alterações benignas	-
-	Displasia leve	NIC I	LSIL	NIC de baixo grau
Classe III	Displasia moderada	NIC II	-	-
-	Displasia acentuada	NIC III	HSIL	NIC de alto grau
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	-	-	-
Classe V	Câncer	Câncer	Câncer	Câncer

Obs.: NIC - Neoplasia intra-epitelial cervical; LSIL - Lesão intra-epitelial de baixo grau (Low grade squamous intraepithelial lesion); HSIL - Lesão intra-epitelial de alto grau (High grade squamous intraepithelial lesion); o Sistema de Bethesda inclui ainda as categorias ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) e AGUS (atypical glandular cells of undetermined significance), em situações em que existem atipias celulares mas em grau insuficiente para permitir um diagnóstico de lesão intra-epitelial. Fonte: Adaptado de <http://www.cervical.com.br>

O ácido tricloroacético (ATA), usado em solução oficial de 80% a 90%, é um agente muito cáustico, que pode causar danos à pele sã. Entretanto, como não provoca alterações sistêmicas ou no conceito, não tem contra-indicação durante a gestação. De uso restrito à pele, está indicado, sobretudo, na presença de hiperkeratose em lesões clínicas ou subclínicas, vulvares e penianas. É aplicado diretamente na área infectada e lavado várias horas mais tarde. Há alguma ardência ou incômodo que pode durar por vários minutos após a aplicação. Desconforto moderado pode persistir, durante vários dias após o tratamento (Passos, 1995; Jorge *et al*, 2000; Virusonline, 2002).

O interferon é uma glicoproteína de ação endógena e intracelular, que inibe a multiplicação da célula virótica e torna as células não-infectadas refratárias à infecção (ação antivirótica). Inibe a multiplicação celular e a proliferação epitelial dos condilomas (ação antiproliferativa) e também estimula as células "natural killers", os linfócitos T-citotóxicos e os macrófagos (ação imunomoduladora); pode ser usado através de gel, creme, pomada, injetado dentro da lesão, ou de uso parenteral, ou seja, através de injeção intramuscular ou sub-cutânea. O tratamento com interferon elimina a verruga completamente em 50% dos pacientes. A excisão cirúrgica da lesão seguida de tratamento adjuvante com interferon tem-se revelado um método terapêutico bastante eficaz (Jorge *et al*, 2000; Higfly, 2002; Medstudents, 2002; Virusonline, 2002).

O 5-fluorouracil a 5%, na forma de creme, é um agente citotático indicado nas lesões uretrais, vesicais, verrugas vaginais e anais extensas. Aplica-se topicamente. A toxicidade é pequena, desde que seja usada de forma correta (aplicação em varredura), mas a eficácia não é muito satisfatória: 59% de insucessos no tratamento dos carcinomas *in situ* (Naud, 1993; Passos, 1995; Veronesi *et al*, 1996; Virusonline, 2002).

Há poucos trabalhos sobre a eficácia da interleucina 2 (IL-2) no tratamento de lesões pelo HPV. A expectativa é que possa ser utilizada em lesões por HPV refratárias, embora seu uso em lesões benignas possa ser limitado devido ao risco de eventos adversos (Jorge *et al*, 2000).

O Isoprinosine é um derivado sintético purínico que aumenta o poder de fagocitose, o número de linfócitos T auxiliares e a produção de mediadores clínicos dos linfócitos T (interferon, linfocina, interleucina-2) e estimula os linfócitos T citotóxicos. Administrado por via oral, parece ser importante para os casos de recidiva após tratamento com agentes físicos (Jorge *et al*, 2000).

O tratamento de vaporização a laser de CO₂ das verrugas com tratamento adjuvante de 5-fluorouracil em creme, torna os tecidos afetados sadios mais rapidamente, alcança o nível certo de tecido e demonstra alta eficiência quando comparado a outras terapias. As taxas de cura de infecção genital por HPV com terapia de laser de CO₂ são altas, variando de 31 a 94%. Apesar de remover as verrugas o laser de CO₂ não erradica o HPV de tecido contaminado (Medstudents, 2002).

Pacientes com pequenas verrugas genitais são comumente tratados com aplicações semanais de nitrogênio líquido nas lesões; o que caracteriza a crioterapia, que aplicado diretamente sobre a verruga causa uma sensação de resfriamento, de pulsação e em seguida queimação. O nitrogênio líquido não danifica o DNA do HPV, mas age *in vivo* causando remoção física do tecido infectado. A crioterapia apresenta consideráveis taxas de recorrência, apesar de também apresentar taxas altas de cura (Medstudents, 2002; Virusonline, 2002).

Para verrugas genitais externas persistentes usa-se

eletrocauterização. Neste processo uma corrente elétrica é usada para queimar as verrugas. A vulvectomia deve ser reservada para pacientes com condilomas gigantes, ou quando houver concomitância com o câncer da vulva (Passos, 1995; Virusonline, 2002).

Utilizando-se de imunoterapia tem-se duas opções: o Imiquimod e os retinóides. O Imiquimod, em creme a 5% para uso tópico, é uma substância química que tem sido testada para o tratamento de verrugas genitais externas. Seu exato mecanismo de ação ainda permanece desconhecido, mas sabe-se que é um potente indutor do interferon alfa e de outras citoquinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina-6. Acredita-se, portanto, que age aumentando a resposta imunológica. Os retinóides são uma classe de componentes naturais ou sintéticos relacionados a vitamina A, que por sua vez possui aplicabilidade clínica bastante relevante em termos de terapia dermatológica. Utilizados em solução a 0,025%, 0,05% e 0,1%, os retinóides têm mostrado eficácia no tratamento e prevenção de cânceres invasivos e de pré-câncer de pele, cérvix e vulva, relacionados a infecção pelo HPV. Ligam-se a receptores celulares específicos, produzindo efeitos que vão desde alteração na proliferação da epiderme até a diferenciação da queratina. Além disso, os retinóides têm mostrado boa atividade imunomoduladora. Assim, tem efeito similar ao dos interferons, além de boa aplicabilidade terapêutica na infecção pelo HPV, uma vez que a replicação do papilomavírus é associada à diferenciação queratinocítica (Jorge *et al*, 2000).

A *Thuya occidentalis*, vem sendo utilizada com índice referido de cura de 84,2%, porém faltam estudos randomizados para comprovação científica da real eficácia desta planta, mas dependendo das lesões, existem propostas de tratamento por via oral e tópica, como *Thuya occidentalis* CH 12: 5 gotas duas vezes ao dia (manhã e noite), por 30 dias. Em casos de recidivas de infecção pelo HPV, pode-se associar nosódio *Carcinosinum* CH 200: 10 gotas uma vez por semana, concomitante a *Thuya occidentalis*. No insucesso do tratamento com a *Thuya occidentalis*, utiliza-se o *Acidum aceticum*, em aplicação tópica: solução de ácido acético 10% + manteiga de cacau qsp. Um óvulo vaginal por 15 dias (Passos, 1995; Jorge *et al*, 2000).

A acupuntura, termo genérico, consiste na estimulação de determinados pontos da pele, por diferentes meios, como inserção de agulhas, manipulação digital, radiação luminosa monocromática, corrente elétrica, aquecimento, sucção, que visam interferir na circulação do Ch'i pelos meridianos. Aguarda-se a realização de pesquisas para comprovar a possibilidade de recomendação dessa modalidade terapêutica no tratamento adjuvante de lesões pelo HPV (Jorge *et al*, 2000).

Atualmente o desenvolvimento de vacinas contra o HPV é prioridade para as Indústrias Farmacêuticas. Seis diferentes tipos de vacinas estão sendo testados por 4 laboratórios diferentes. Em Cambridge, estão em desenvolvimento 3 vacinas: TA-HPV, que utiliza vírus lítico recombinante vivo para imunoterapia de câncer cervical; TA-GW, que utiliza proteínas recombinantes para imunoterapia de verrugas genitais; TA-CIN para tratamento de pacientes com displasia cervical. Os resultados dos testes clínicos da TA-HPV foram encorajadores, onde se verificou que todos os pacientes vacinados desenvolveram anticorpos para o vírus lítico. Em Gaithersburg, EUA, estão ocorrendo testes clínicos com a vacina MED-501 a qual é profilática para verrugas genitais. Ela contém proteína recombinante L1 do HPV-11. Ainda nos EUA ocorre o preparo de uma vacina para prevenir verrugas genitais e câncer cervical. Esta

vacina possui partículas vírus-like recombinantes. Outra vacina em estudo pelo mesmo laboratório usa o plasmídeo do DNA livre. Um outro tipo de vacina é a vacina autógena. A extirpação cirúrgica da lesão, seguida por vacinação autógena pode ser o método mais eficaz de tratamento da condilomatose anal e perianal (Medstudents, 2002).

Pessoas imunossuprimidas em decorrência da infecção pelo HIV, ou por outras razões, podem não responder ao tratamento para o HPV como as imunocompetentes e podem acontecer recidivas mais frequentes. O carcinoma escamoso pode surgir mais frequentemente em imunossuprimidos, valorizando a biópsia de lesões neste grupo de pacientes. O tratamento para esses pacientes, deve basear-se nos mesmos princípios referidos para os HIV negativos.

Planejar o tratamento juntamente com o paciente é importante porque muitos pacientes necessitarão de mais de uma sessão terapêutica. Deve-se mudar a opção terapêutica quando um paciente não melhorar substancialmente depois de três aplicações, ou se as verrugas não desaparecerem completamente após seis sessões. O balanço entre risco e benefício do tratamento deverá ser analisado no decorrer do processo para evitar tratamento excessivo.

Raramente ocorrem complicações se os tratamentos são utilizados corretamente. Os pacientes deverão ser advertidos da possibilidade de cicatrizes hipo ou hipertróficas quando são utilizados métodos destrutivos. Também podem resultar, embora raramente, em áreas deprimidas ou hipertróficas, especialmente se o paciente não teve tempo suficiente para cicatrização total antes de uma nova sessão terapêutica. Mais raramente, o tratamento pode resultar em síndromes dolorosas incapacitantes, como vulvodínia ou hiperestesia do local tratado (Sobral, 2002).

CONCLUSÕES

As infecções genitais, anais e perianais por HPV são doenças sexualmente transmissíveis que se manifestam em homens e mulheres e incluem infecção latente sub-clínica, verrugas clinicamente aparentes, citologia genital anormal e carcinoma escamoso. Atualmente, a incidência, além de alta, está crescendo vertiginosamente, apesar das mudanças no comportamento sexual da população mundial.

Como a presença de infecções por HPV está, sabidamente, associada ao desenvolvimento do câncer cervical e de câncer escamoso das células genitais está ocorrendo um progressivo aumento do interesse da comunidade científica em aperfeiçoar as técnicas de tratamento, atualmente, utilizadas e em desenvolver novos métodos de tratamento e profilaxia das infecções por HPV.

As dificuldades terapêuticas, a persistência da doença, as recidivas constantes, a inexistência de vacina eficaz contra a infecção induzida por HPV e de terapia imunológica específica que atue contra as lesões já instaladas, levamos a pensar em que atitudes tomar para impedir a transmissão e o aumento da incidência desta virose.

Provavelmente, os únicos métodos profiláticos da infecção causada por HPV sejam a abstinência sexual e a monogamia mútua, atitudes muito pessoais sobre as quais seria desaconselhável, imprudente e autoritária a intervenção do médico. Todavia, atualmente, algumas medidas deverão ser tomadas para reduzir os riscos da transmissão: limitar o número de parceiros, investigar e tratar o(s) parceiro(s), evitar o coito durante o tratamento e o seguimento da doença. Várias vacinas estão em desenvolvimento, apresentando re-

sultados animadores, o que indica que, talvez, futuramente, este seja o melhor método de profilaxia das infecções por HPV.

REFERÊNCIAS

1. Abordagem Terapêutica e Profilática das Infecções por Papilomavírus Humano. Disponível no site: <http://www.medstudents.com.br/original/revissao/hpv/hpv.htm>.
2. ACOG – American College of Obstetricians and Gynecologists. (2000, accessed 2001, May 23). "Make Decisions about Human Papillomavirus Based on Sound Medicine, Rather than Politics." [Online] http://www.acog.org/from_home/departments/dept_notice.cfm?recno=11&bulletin=1083.
3. Anttilä, Tarja et al. (2001). "Serotypes of *Chlamydia Trachomatis* and Risk for development of Cervical Squamous Cell Carcinoma". *The Journal of the American Medical Association*, 285 (1), 47-51.
4. Cates, Willard. (1999). "Estimates of the Incidence and Prevalence of Sexually Transmitted Diseases in the United States". *Sexually Transmitted Diseases*, 26 (4), s2-s7.
5. CDC- Centers for Diseases Control and Prevention. (1999, accessed 1999, October 1). STD Trends. [Online]. http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/Stats_Trends/STD_Trends/pdf
6. Elfgrén, Kristina, et al. (2000). "A Population-Based Five-Year Follow-Up Study of Cervical Human Papillomavirus Infection." *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 183 (3), 561-567.
7. Guidelines for the Medical Management of Genital warts and/or Genital HPV in New Zealand, 1999.
8. Haas, P.; Tenconi, P.; Heck, V.H.; Thiesen, K.; Bianchini, E.; Filippini, C.A.F.; Ropelatto, C.; Silva, A.S. Papiloma Vírus Humano como Fator Etiológico Central no Câncer de Colo de Útero. *News Lab*, p. 84-96, 2000.
9. Ho, Gloria et al. (1998). "Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women". *New England Journal of Medicine*, 338 (7), 423-428.
10. HPV – Uma Epidemia que é um Problema Multidisciplinar. Disponível no site: www.urocontemp.com.br/enfoque.html.
11. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Disponível no site: www.aids.gov.br.
12. Infecção pelo Papilomavírus (HPV). Disponível no site: www.funasa.com.br.
13. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Disponível no site: <http://www.sobral.ce.gov.br/saudedafamilia/Publicacoes/DST/papiloma%20virus.htm>.
14. Jacyntho, C.; Filho, G.A.; Maldonado, P. *HPV- Infecção Genital Feminina e Masculina*. Rio de Janeiro: Revinter, 1996.
15. Janicek, Mike & Averette, Hervy. (2001). "Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis and Therapeutics." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 51 (2), 92-114.
16. Jay, Naomi & Moscicki, Anna-Barbara. (2000). "Human Papilloma Virus Infection in Women." In: Marelene Goldman & Maureen Hatch, eds. *Women & Health*. San Diego, CA: Academic Press.
17. Jorge, J.P.N et al. Tratamento-Abordagem no Homem e na Mulher. In: Carvalho, J.J.M.; Oyakawa, N. (ED). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus Humano*. São Paulo: BG Cultural, p. 111-128, 2000.
18. Koutsky, Laura. (1997). "Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection." *The American Journal of Medicine*, 102 (5A), 3-8.
19. Koutsky, Laura & Kiviat, Nancy. (1999). "Genital Human Papillomavirus." In: King Holmes et al., eds. *Sexually Transmitted Diseases*, 3rd ed. New York: McGraw-Hill.
20. Kurman, R.J.; Solomon, D. *O Sistema Bethesda para o Relatório de Diagnóstico Citológico Cervicovaginal*. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.
21. McDermott-Webster, Marian. (1999). "The HPV Epidemic." *American Journal of Nursing*, 99, 24L-24N.
22. Naud, P.; Monsonego, J.; Dargent, D. Infecção pelo P Papilomavírus Humano. In: Naud, Paulo. *DST e AIDS*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.
23. NCI- National Cancer Institute. (1999, accessed 2001, May 21). Cervical Cancer: Background. [Online]. <http://rex.nci.nih.gov/massmedia/backgrounders/cervical.html>
24. Okada, M.M.K. et al. Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho, J.J.M.; Oyakawa, N. (Ed.). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus Humano*. São Paulo: BG Cultural, p. 1-6, 2000.
25. Papilomavírus Humano e Câncer do Colo do Útero. Disponível no site: www.hcanc.org.br/hpv1.html Pesquisa.
26. Papilomavírus Humano. Disponível no site: <http://www.higgfly.com.br/dossie.htm>.
27. Papilomavírus Humano. Disponível no site: <http://virusonline.virtualave.net/hpv.htm>.
28. Passos, M.R.L. *DST*. 4 ed. Cultura Médica, 1995.
29. Presença de HPV nos Fluidos em Geral. Disponível no site: www.cervical.com.br.
30. Rastreamento, Diagnóstico e Tratamento do Carcinoma do Colo do Útero. Disponível no site: http://.../Carcinoma_Colo_Utero.pdf+papiloma+virus+humano&hl=pt&lr=lang_pt&ie=UTF-
31. Rastreo de Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres que têm ou tiveram DST. Disponível no site: www.aids.gov.br.
32. Red Book, 1997.
33. Stevens – Simon, Catherine et al. (2000). "The Prevalence of genital Human Papillomavirus Infections in Abused and Nonabused Preadolescent Girls." *Pediatrics*, 106(4), 645-649.
34. "The Cervical Cancer Virus". (1995). *Discover*, 16, 24-26.
35. Veronesi, R.; Focaccia, R. *Tratado de Infecologia*. São Paulo: Atheneu, 1996.
36. World Health Organization, Geneva, 2001. Assessment and harmonization of laboratory diagnostic procedures related to human papillomavirus vaccine research and development. *Report of a technical meeting Heidelberg*. Heidelberg, 6-7 março de 2001.

Endereço para correspondência

Professora Patrícia Haas

Departamento de Análises Clínicas

Universidade Federal de Santa Catarina / Florianópolis - SC.

e-mail: haas@ccs.ufsc.br

Padronização de *spot tests* para uso em laboratórios com atendimento em emergências toxicológicas*

Using standardization *spot tests* in laboratories with toxicological emergencies service

Carla Brugjn Marek¹, Rafaela dal Piva² & Ana Maria Itinose¹

RESUMO – A padronização de métodos simples e confiáveis em laboratórios de análises clínicas que atuam em emergências toxicológicas é importante, visto o alto índice de intoxicações apresentado nas mais diversas regiões do país. Dentre as intoxicações, as de maior destaque são as medicamentosas. Os medicamentos mais envolvidos são os analgésicos, os benzodiazepínicos e os barbitúricos (fenobarbital). Assim, foram padronizados alguns *spot tests*, segundo Brito Filho, para a pesquisa destes medicamentos em sangue e urina. Os resultados mostraram-se satisfatórios, com valor de sensibilidade de 0,1 e 0,3mg/mL, consistindo em provas simples, rápidas, de baixo custo e de fácil implantação em laboratórios clínicos.

PALAVRAS-CHAVE – Intoxicações, medicamentos, *spot tests*.

SUMMARY – The simple standardization and reliable methods in laboratories of clinical analysis that act in toxicological emergencies is important, seen the high index of intoxications presented in the most several areas of the country. Among the intoxications, the one of larger prominence are the drugs. The drugs more involved are the analgesics, the benzodiazepins and the barbiturates (fenobarbital). Like this, some *spot tests* were standardized as Brito Filho for the research of these drugs in blood and urine. The results were shown satisfactory, with sensibility value of 0.1 and 0.3mg/mL, by simple proofs, fast and low cost and easy implantation in clinical laboratories.

KEYWORDS – Intoxications, drugs, *spot tests*.

INTRODUÇÃO

Os acidentes envolvendo medicamentos normalmente são uma emergência clínica, visto que muitos casos estão relacionados às tentativas de suicídio ou envolvem crianças e idosos que se expuseram a doses acima da terapêutica. Estas situações resultariam em uma concentração tóxica na corrente sanguínea. Dentre os medicamentos, os mais relacionados às intoxicações são os analgésicos, os benzodiazepínicos e os barbitúricos, estes representados exclusivamente pelo fenobarbital. No Brasil, os medicamentos assumem o primeiro lugar como agente causador das intoxicações, ocupando esta posição desde 1994^{1,3}.

A intoxicação por medicamentos não é um problema exclusivamente brasileiro, é um problema mundial onde o perfil dos medicamentos envolvidos é muito parecido sendo, em ordem crescente, os benzodiazepínicos, analgésicos, barbitúricos e antidepressivos^{5,7,9,13}.

Geralmente estas intoxicações apresentam quadros graves, havendo a necessidade de tratamento específico. Para isto é imprescindível a realização de exames laboratoriais que auxiliem na elucidação do tipo de medicamento envolvido. Nestes casos, a realização de análises toxicológicas rápidas pode servir para a identificação qualitativa ou quantitativa do medicamento envolvido e, isto é extremamente útil visto que auxilia o profissional clínico a estabelecer uma conduta correta e específica para o tratamento da intoxicação⁸.

Muitas vezes, apenas a identificação do medicamento já é suficiente para o início do tratamento, requerendo a sua quantificação apenas em alguns casos. Existem muitos métodos incluindo os espectrofotométricos, os imunoensaios e as triagens cromatográficas utilizados para esta finalidade. Entretanto, estes requerem

equipamentos, kits para reações imunológicas, sistemas ou aparatos para aplicação e revelação cromatográfica, tornando onerosa uma análise qualitativa. Surgem então, os *spot tests* ou testes de toque, os quais são procedimentos qualitativos, colorimétricos, não instrumentais, que podem ser fácil e rapidamente executados. Estes são valiosos para excluir ou sugerir a presença de determinada substância, principalmente aqueles de interesse em intoxicações agudas^{2,4,12}.

Diante disso, resolveu-se padronizar alguns *spot tests*, segundo Brito Filho⁴, para a identificação de salicilatos, diazepam e fenobarbital em sangue e urina. A simplicidade de execução e a rapidez de obtenção dos resultados permitem a implantação destes testes em laboratórios clínicos que prestam serviço de emergência toxicológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os métodos descritos por Brito Filho⁴. Para otimizar os testes foram utilizados 0,25mL de amostra de sangue e de urina. Todos os reagentes foram de grau analítico.

Para a pesquisa de salicilatos adicionou-se 0,25mL de cloreto férrico 5% à amostra. O desenvolvimento de coloração violeta indicou a presença de salicilatos. Para o fenobarbital adicionou-se 2mL de hidróxido de sódio 0,5N e permanganato de potássio 0,5N. O teste foi positivo com o aparecimento de coloração verde passando ao amarelo-marrom. Para o diazepam utilizou-se 0,5mL de Reativo de Marquis, e o desenvolvimento de coloração amarela indicou a presença do composto.

Para verificar a sensibilidade dos testes, foram usadas concentrações entre 0,1mg/mL e 5mg/mL dos respectivos padrões de fármacos. Todos os testes foram realizados, no mínimo, em triplicata.

Recebido em 2/2/2004
Aprovado em 2/8/2004

*Trabalho realizado no Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

¹ Prof^a de Toxicologia do Curso de Farmácia da Univ. Estadual do Oeste do Paraná; ² Acadêmica do Curso de Farmácia da Univ. Estadual do Oeste do Paraná

RESULTADOS

Nas Tabelas I, II e III são mostradas as sensibilidades, em mg/mL, dos fármacos pesquisados. A positividade e a negatividade das reações estão expressas em (+) e (-), respectivamente. A intensidade de coloração obtida está representada por (+), (++) e (+++) para intensidades fracas, evidentes e fortes, respectivamente.

TABELA I

Sensibilidade do *spot test* para salicilatos em amostras de sangue e de urina

Tipo de amostra	Concentração de salicilatos (mg/mL)					
	1	0,8	0,5	0,3	0,2	0,1
Sangue	+	+	+	+	-	-
Urina	+	+	+	+	+	-

TABELA II

Sensibilidade do *spot test* para fenobarbital em amostras de sangue e de urina

Tipo de amostra	Concentração de salicilatos (mg/mL)						
	2	1	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05
Sangue	+++	+++	++	++	++	+	-
Urina	+++	+++	++	++	+	+	-

TABELA III

Sensibilidade do *spot test* para diazepam em amostras de sangue e de urina

Tipo de amostra	Concentração de salicilatos (mg/mL)							
	2	1	0,8	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05
Sangue	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
Urina	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-

DISCUSSÃO

Os *spot tests* são desenvolvidos para a detecção qualitativa rápida e com boa sensibilidade para a presença de medicamentos ou de outras substâncias tóxicas. São testes práticos podendo, após a sua padronização, ser utilizados de maneira segura em laboratórios clínicos. A utilização destes testes é justificada por consistir em provas simples, rápidas, não onerosas e com boa sensibilidade.

Existem diversos métodos para a pesquisa de salicilatos em sangue ou urina; entretanto os mais utilizados são aqueles que empregam técnicas colorimétricas¹⁰. Apesar de atualmente existirem imunoenaios, estes ainda não são de uso rotineiro visto o custo relativamente alto de seus kits, além da necessidade de equipamentos apropriados para a análise imunológica⁶. No *spot test* selecionado, a reação de cor é produzida quando o salicilato forma um complexo com os íons férricos fornecidos pelo cloreto férrico. A sensibilidade encontrada foi de 0,2mg/mL e 0,3mg/mL para as amostras de urina e sangue, respectivamente (Tab. I). Recomenda-se tomar cuidado ao realizar este teste em amostras de urina. Apesar do teste mostrar sensibilidade melhor na urina do que em sangue, deve-se considerar que a urina excreta inúmeras substâncias, podendo existir compostos como, por exemplo, cetonas que interferem no teste conferindo um resultado falso-positivo. Para minimizar esta interferência, recomenda-se ferver a urina por 15 minutos antes da realização do teste.

O teste para fenobarbital apresentou sensibilidade de 0,1mg/mL para as amostras de sangue e urina (Tab. II). Neste teste o hidróxido de sódio reage com o fenobarbital formando um composto p-hidroxi análogo, o p-hidroxifenobarbital. Este por sua vez, reage imedia-

tamente com o permanganato de potássio, desenvolvendo a coloração verde que passa rapidamente ao amarelo-marrom¹¹.

No *spot test* para o diazepam, encontrou-se sensibilidade de 0,1mg/mL e 0,2mg/mL para sangue e urina, respectivamente (Tab. III). O método baseia-se na formação de benzofenona por hidrólise ácida dando coloração amarela ao meio. Este teste não é específico para o diazepam, podendo ser utilizado para a pesquisa de outros benzodiazepínicos. Trata-se, porém, de um método bastante útil na rotina toxicológica, pois nos casos suspeitos de intoxicação por estes compostos é importante diferenciá-los de outros depressores do sistema nervoso central, como os barbitúricos. Estes apresentam um quadro de intoxicação semelhante ao dos benzodiazepínicos, porém com conduta de tratamento diferente. Assim, para a pesquisa destes compostos, um resultado negativo é de grande valia para o clínico em emergências toxicológicas⁸.

Apesar da boa sensibilidade dos *spot tests* estudados, estes não podem ser utilizados para fins conclusivos, servindo apenas como um parâmetro preliminar no laboratório. Após esta triagem inicial devem ser realizados os testes confirmatórios, que podem ser qualitativos ou quantitativos, dependendo do fármaco pesquisado².

CONCLUSÕES

Os *spot tests* demonstraram boa sensibilidade, consistindo em provas simples, rápidas e não onerosas. Deve-se considerar com cuidado a interpretação dos resultados, principalmente aqueles testes sujeitos a falso-positivo como os salicilatos na urina.

A utilização dos referidos testes por outros laboratórios deve ser feita após estabelecidos os parâmetros próprios de cada laboratório, pois estes podem sofrer alterações dependendo das condições do ambiente (temperatura, umidade, luz) e da qualidade dos reagentes utilizados.

Os *spot tests* mostraram-se viáveis para a implantação na rotina de laboratórios clínicos que atendem emergências toxicológicas.

REFERÊNCIAS

- Alonzo, H.G.A.; Corrêa, C.L.; Zambrone, F.A. D. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroidais: dados epidemiológicos em seis centros de controle de intoxicações do Brasil. *Rev. Bras. Toxicol.* 14(2):49-54, 2001.
- Andrade, A.F.; Campolina, D.; Dias, D. Toxicologia na Prática Clínica. Belo Horizonte, Follium, 2001.368p.
- Bortoletto, M.E.; Bochner, R. Impacto dos Medicamentos nas Intoxicações Humanas no Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 15(4):859-869, 1999.
- Brito, M.F. Toxicologia Humana Geral. 2ª ed. São Paulo, Atheneu, 1988. 641p.
- Bucley, N.A. Self poisoning in Newcastle, 1987-1992. *Medicinal Journal Australian.* 162:190-193, 1995.
- Goslin, J.P.A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.*36:1408-1427, 1999.
- Henderson, A.; Wright, M.; Pond, S.M. Experience with 732 acute overdose patients admitted to intensive care unit over six years. *Medicinal Journal Australian.* 148:20-30, 1993.
- Larini, L. Toxicologia. 3ª ed. São Paulo, Manole, 1997. 315p.
- Michel, K.; Arestegui, G.; Spuhler, T. Suicide and psychotropic drugs in Switzerland. *Pharmacopsychiatry.*27:114-118, 1994.
- Moraes, R.L.F.; Sznelwar, R.B. Determinação de salicilemia pelo método colorimétrico de Trinder e espectrofluorimétrico de Baselt. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo.* 23:159-169, 1987.
- Moraes, E.C.F.; Sznelwar, R.B.; Fericola, N.A.G.G. Manual de Toxicologia Analítica. São Paulo, Roca, 1991. 229p.
- Pérez, E.A.; Castro, E.R.; Fernández, T.H. Sistemática utilizada en el centro nacional de toxicología. Urgência toxicológica. *Rev. Cubana Med. Milit.* 29(1):36-40, 2000.
- Schreiner, D.; Frey, R.; Vycudilik, W.; Berzlanovich, A.; Kasper, S. Different fatal toxicity of neuroleptics identified by autopsy. *European Neuropsychopharmacology.* 11:117-124, 2001.

Endereço para correspondência

Carla Brugin Marek

Lab. de Tox./Curso de Farmácia/Univ. Est. Oeste do Paraná

R. Universitária, 2064 - Jd. Universitário - Cascavel - Paraná - 85812-020

e-mail: cbmarek@unioeste.br

Diagnóstico e prevenção de parasitoses no reassentamento São Francisco em Cascavel - PR*

Diagnosis and parasitosis prevention at São Francisco replacement, Cascavel - PR*

Juliana Ribeiro Ferreira¹, Fernanda Volpato¹, Fabio Martinez Carricondo¹, Juliana Curi Martinichen² & Veridiana Lenartovicz²

RESUMO – As parasitoses intestinais ainda constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo e com condições precárias de saneamento básico, sendo as crianças em idade escolar as mais acometidas por essas infecções. O objetivo do trabalho foi avaliar a prevalência de enteroparasitoses em crianças que frequentam a Escola Estadual São Francisco de Assis, localizada no Reassentamento São Francisco de Assis/ Cascavel-PR, bem como o desenvolvimento de atividades visando a prevenção de parasitoses para as crianças, professores e funcionários da escola. Analisou-se as amostras fecais de 127 crianças, das quais 11% (14) estavam parasitadas. Observou-se que os protozoários mais frequentes foram *Entamoeba coli* e *Giardia lamblia* enquanto o *Ascaris lumbricoides* teve maior prevalência entre os helmintos. Além do encaminhamento para o tratamento adequado, realizou-se um teatro com a comunidade escolar, visando a reeducação da população quanto as medidas básicas de higiene e os cuidados com a água e os alimentos. Apesar da baixa condição sócio-econômica das crianças analisadas, o índice de parasitismo foi inferior ao já observado por outros autores, indicando que apesar das dificuldades, as crianças conhecem cuidados e medidas profiláticas eficazes para o combate aos parasitas.

PALAVRAS-CHAVE – Parasitoses intestinais, crianças, profilaxia.

SUMMARY – The intestinal parasitosis still constitute a serious problem of public health in Brazil, presenting larger prevalence in populations of lower socioeconomic level and with precarious conditions of basic sanitation, being the children in school age the more attacked by those infections. The objective of this work was to evaluate the enteroparasitosis prevalence in children who frequent the State School São Francisco de Assis, located at São Francisco replacement, Cascavel - PR, as well as the development activities seeking the parasitosis prevention for the children, teachers and employees of the school. It was analyzed 127 children's fecal samples, from which 11% (14) were sponged. It was observed that the most frequent protozoa were *Entamoeba coli* and *Giardia lamblia* while the *Ascaris lumbricoides* had larger prevalence among the helminths. Besides the direction for the appropriate treatment, it took place a theater with the school community, seeking the population reeducation with basic measures of hygiene and the cares with water and food. In spite of the low socioeconomic condition and difficulties, the index of parasitism in those children was inferior as observed by other authors; indicating as they should know prophylactic cares and effective measures to combat the parasites.

KEYWORDS – Intestinal parasitosis, children, prophylaxis.

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais são doenças cujos agentes etiológicos (helmintos ou protozoários), pelo menos em certas fases do ciclo evolutivo, localizam-se no aparelho digestivo do homem podendo provocar diversas alterações patológicas (Rawellins, 1991). Tais agentes ainda constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo e com condições precárias de saneamento básico, resultando em altos índices de morbidade (Uchôa *et al.*, 2001). Além dos efeitos patológicos diretos destes parasitas sobre a saúde, as infecções parasitárias exercem importante influência sobre o estado nutricional, crescimento e função cognitiva de escolares (Neves, 2000). O principal sintoma das parasitoses intestinais é a diarreia, mas os parasitas intestinais contribuem ainda para um quadro clínico de anemia, perda de peso, dores abdominais, dificuldades no aprendizado, ansiedade, nervosismo, e em casos mais graves, morte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de enteroparasitoses em crianças que frequentam a Escola Estadual São Francisco de Assis, localizada no Reassentamento São Francisco de Assis/ Cascavel-PR, bem como o desenvolver de atividades visando prevenção e controle de parasitoses intestinais neste local.

MATERIAIS E MÉTODOS

Crianças de ambos os sexos, cursando Jardim, Pré e 1ª a

4ª séries da Escola Estadual São Francisco de Assis foram submetidas a exames parasitológicos de fezes para a pesquisa de parasitas intestinais, no período compreendido entre maio e agosto de 2003. As amostras foram coletadas em recipientes plásticos devidamente identificados com o nome e série de cada criança e encaminhadas ao laboratório de Parasitologia Clínica do Hospital Universitário do Oeste do Paraná no município de Cascavel - PR. Foi adicionado formaldeído 10% como conservante às amostras e estas foram armazenadas em geladeira para serem, posteriormente, analisadas. Os métodos utilizados para a análise das amostras fecais foram o método a fresco e o método de Hoffman (Hoffman, 1934). Os resultados foram levados à escola e entregues aos alunos. No caso de resultados positivos, uma carta foi encaminhada aos pais ou responsáveis, aconselhando levar a criança ao médico para se fazer o devido tratamento. Aos pais ou responsáveis pelas crianças, foi entregue um questionário com questões de múltipla escolha, contendo dados como nível sócio-econômico, hábitos higiênicos, características clínicas, entre outras observações.

Realizou-se uma apresentação teatral de fantoches para as crianças, além de professores e funcionários da escola, enfocando as necessidades básicas de higiene, cuidados com a água e os alimentos e as principais formas de transmissão das parasitoses intestinais e sua prevenção, com o intuito de promover uma melhor aprendizagem desses temas pelas mesmas.

Recebido em 20/2/2004

Aprovado em 30/7/2004

* Laboratório de Parasitologia Clínica, Colegiado de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE.

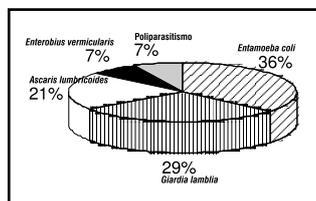
1. Acad. do curso de Farmácia da Univ. Est. do Oeste do Paraná - UNIOESTE; 2. Docentes da disc. de Parasitologia Clínica da Univ. Est. do Oeste do Paraná - UNIOESTE

RESULTADOS

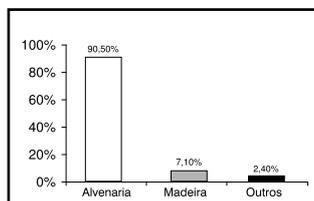
A Escola Estadual São Francisco de Assis, localizada no Reassentamento São Francisco de Assis do Município de Cascavel-PR, é uma escola da zona rural. De um total de 127 amostras coletadas na escola, 88,98% estavam não infectadas, indicando um grau de negatividade considerável; e 11,02% estavam infectadas com algum tipo de parasito intestinal. Dentre os parasitos comensais, foi detectado que 36% das crianças apresentavam-se infectadas por *Entamoeba coli* e o protozoário causador de patogenia mais freqüente foi a *Giardia lamblia* (29%). A prevalência de *Ascaris lumbricoides* foi de 21% e de *Enterobius vermicularis* de 7%, ambos de contaminação oral-fecal, com grande prevalência entre crianças. Deve ser relatado que apenas 7% das crianças eram portadores de mais de um parasita intestinal (Gráfico 1).

Após a realização dos exames parasitológicos de fezes, os resultados foram enviados aos pais das crianças, juntamente com questionários sócio-econômicos. Através dos questionários preenchidos foi possível verificar que 90,50% das famílias residem em casa de alvenaria, como mostrado no Gráfico 2. Observou-se que a positividade poderia ter sido mais alta, uma vez que a região é uma zona rural e, portanto, na maioria das casas (73,80%), não havia rede de esgoto (Gráfico 3) e a ausência de pavimentação nas residências também prevaleceu (95%), resultado este não mostrado em gráficos.

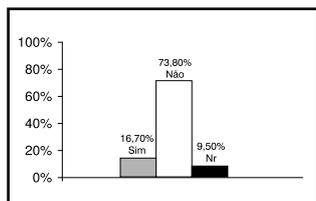
Observou-se que 78,57% dos indivíduos utilizam água proveniente de poços artesianos, sem qualquer tratamento, e uma pequena parcela (2,38%) utiliza água mineral ou filtrada. O Gráfico 4 mostra a porcentagem de crianças que já havia realizado exame parasitológico anteriormente a este trabalho, sendo que a maioria (83,3%), nunca havia feito o exame. Além disso, é relatado também que mesmo sem a realização dos exames, 90,5% das crianças já tinha realizado tratamento contra parasitas intestinais, mostrando que esse tratamento ocorreu sem acompanhamento médico e de forma descontrolada.



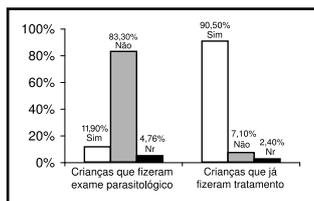
GRÁF. 1 - Incidência de parasitas intestinais nas crianças da Escola São Francisco de Assis.



GRÁF. 2 - Tipo de moradia.



GRÁF. 3 - Porcentagem de residências com rede de esgoto.



GRÁF. 4 - Relação entre exames parasitológicos e tratamento anti-parasitário.

DISCUSSÃO

Apesar da escola na qual foi realizado o trabalho se localizar na zona rural, a incidência das parasitoses intestinais foi baixa (11,02%) se comparada com trabalhos realizados anteriormente com escolares, como o de Marinho e cols (2003), e creches municipais a exemplo o de Bezerra e cols (2003), que mostraram um índice de parasitoses mais elevado, por volta de 30 a 40%. O índice mais baixo de crianças parasitadas mostrado nos resultados, pode dar-se ao fato da escola ter como funcionária uma agente comunitária de saúde que orienta os alunos quanto a higiene sanitária e alimentar. Além do que, a escola foi visitada durante

o ano de 2002 pelo Programa Universidade Solidária. Uma outra possibilidade para o baixo índice de parasitoses é o tratamento contra vermes que é realizado, por algumas famílias, de forma rotineira. A *Giardia lamblia* foi encontrada em grande número de crianças e, segundo Rey (2001), essa infecção acontece com maior prevalência em crianças, até a puberdade, decaindo para taxas muito menores, não se sabendo se devido a imunidade ou a outras condições fisiológicas. Além do que, a incidência é maior entre os grupos populacionais que apresentam condições higiênicas mais precárias e ambientes coletivos.

Crianças em idade escolar também são bastante acometidas por *Ascaris lumbricoides*, estando sob maior risco de infecção e migração ectópica dos mesmos (Markell e cols, 2003).

A informação de que a maioria da população consome água sem tratamento é um dado preocupante, pois sabe-se que o tratamento da água é de muita importância para a prevenção das parasitoses intestinais, pois as mesmas podem ser transmitidas pela água ingerida ou utilizada para preparar os alimentos. Além disso, as frutas e verduras são, na sua maioria, obtidas das hortas e pomares existentes nas próprias residências, podendo ser fontes de infecção para as crianças, se não forem lavadas e tratadas adequadamente. Além disso, o relato de que mesmo sem a realização dos exames, 90,5% das crianças já tinha realizado tratamento contra parasitas intestinais, mostra que esse tratamento é realizado sem acompanhamento médico.

A apresentação teatral realizada com a comunidade escolar foi de grande aproveitamento, pois pôde-se perceber o interesse e a compreensão tanto por parte dos alunos quanto dos funcionários, das medidas preventivas a serem adotadas para o combate às parasitoses intestinais.

Apesar das dificuldades de falta de saneamento básico e condições de higiene adequadas às populações de renda mais baixa, o trabalho de controle de parasitoses, bem como de outras doenças, é de simples execução e cabe aos profissionais da saúde contribuírem para uma melhor conscientização da população, buscando cada vez mais a erradicação das mesmas para uma melhoria da qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à coordenação da Escola São Francisco de Assis em Cascavel, pela colaboração; às crianças, pais ou responsáveis, além das agentes comunitárias de saúde. Agradecemos especiais aos acadêmicos do 2º ano do curso de Farmácia da UNIOESTE pela apresentação com os fantoches.

REFERÊNCIAS

- Bezerra, F.S.M.; Oliveira, M.F.; Miranda, A.L.M.; Pinheiro, M.C.C.; Teles, R.M.A. Incidence of intestinal parasites in sub-nail and fecal materials in children of Daycare Center Aprisco - Fortaleza, CE. Bras. Anal. Clín., vol. 35(1), 2003.
- Hoffman, W.A.; Pons, J.A.; Janer, J.L. Thesedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico J. Publ Health, vol. 9, p 281-298. 1934.
- Marinho, M.S.; Silva, G.B.; Diele, C.A.; Carvalho, J.B. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. Ver. Bras. Anal. Clín., vol. 34(4): 195-196, 2002.
- Markell, E.K.; John, D.T.; Krotoski, W.A. Parasitologia Médica. 8ª ed. Tradução Ione Irulégui. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 2003, 447p.
- Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2000, 524p.
- Rawellins, S.C. Parasitic infections in Young Jamaicans in different ecological zones of the island. Tropical and geographical medicine, v. 43, n.1/2, p.136-141, 1991.
- Rey, L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 2001, 856p.
- Uchôa, C.M.A. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói. Rev. Inst. Adolfo Lutz, Rio de Janeiro, v. 60, n. 2, p. 97-101, out. 2001.

Endereço para correspondência

Veridiana Lenartovicz

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Rua Universitária, 2069 - Jd. Universitário - 858119-110 - Cascavel - PR

Tele: (0xx45)220-3156/324-2830 • vlenartovicz@hotmail.com - veridiana@unioeste.br

Giardíase em creches do município de Maringá, PR

Giardiasis in daycare centers at Maringá, PR

Áurea Regina Telles Pupulin¹, Mônica Lúcia Gomes¹, Maria Luíza G. G. Dias¹, Silvana Marques de Araújo¹, Ana Lucia Falavigna Guilherme¹ & João Balduino Kuhl¹

RESUMO – A giardíase é uma parasitose das mais comuns em crianças menores de 5 anos com prevalência no Brasil de 5,7%, nesta faixa etária (Benfam, 1996). Vários autores afirmam ser um problema comum em instituições como creches e enfermarias infantis. Este trabalho procurou avaliar a prevalência de giardíase em crianças com diferentes níveis cultural e socioeconômico que freqüentam creches no município de Maringá - PR. Foram estudadas três creches. Como metodologia utilizou-se ficha epidemiológica, exame parasitológico de fezes e exame de extrato sub-ungueal. A prevalência de giardíase nas três creches foi de 26,25%, 20,7% e 24,1% não mostrando diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas. Os resultados mostraram que a prevalência de giardíase não sofreu influência do ponto de vista sócio-cultural.

PALAVRAS-CHAVE – Giardíase, creches, prevalência.

SUMMARY – The giardiasis is one of the most common parasitosis in children under 5 years, with 5.7% of prevalence in age group in Brazil (Benfam, 1996). Many authors assert that it is a common problem in institutions such as daycare centers and nurseries. The aim of this work is to evaluate the prevalence of giardiasis in children with different cultural and socio-economical levels, who frequent daycare centers and nurseries in the town of Maringá - PR. Three daycare centers were studied. Epidemiological cards, parasitologic exam of dregs and exams of sub-ungueal extract were used as methodologies. The prevalence of giardiasis in the those daycare centers were 26.25%, 20.7% and 24.1%, which does not show statistically significant differences among them. The results show that the prevalence of giardiasis does not have any influence of the socio-cultural aspect.

KEYWORDS – Giardiasis, daycare, prevalences.

INTRODUÇÃO

A giardíase é uma enteroparasitose determinada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia* (Stiles, 1915), de distribuição cosmopolita. *G. lamblia* foi o parasita mais comum entre as crianças africanas menores de 13 anos (19,0%) que se mudaram para a Noruega (Westerhuis & Mank, 2002). No Brasil, dados de 1996 mostraram que em crianças menores de 5 anos a prevalência desta parasitose foi de 5,7% (Pesquisa nacional sobre demografia e saúde – Benfam).

As infecções humanas com *G. lamblia* são comuns e acometem, principalmente, as crianças na faixa etária de 0 – 5 anos. Isso se deve aos precários hábitos higiênicos desta faixa etária ou a ausência de imunidade a reinfecções (Stanley & Meyer, 1984).

Aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos parasitados tornam-se sintomáticos, podendo manifestar síndrome diarreica com evacuações líquidas, inapetência, emagrecimento, dor epigástrica, insônia, má absorção intestinal e esteatorréia (Garcia *et al.*, 2002). Outras queixas podem ocorrer, como pirose, náusea, vômito, nervosismo, indisposição geral, irritabilidade, tonturas, cefaléia e dificuldade de aprendizado (Donald, 1999).

Vários autores afirmam ser a giardíase um problema comum em instituições, tais como creches e enfermarias infantis, onde o contato pessoa a pessoa é freqüente e as medidas higiênicas são difíceis de ser adota-

das (Bal & Porter, 1984; Black *et al.*, 1977; Meyer & Radulescu, 1980).

A contaminação por cistos de *Giardia* pode ocorrer através de via fecal-oral (Marzochi & Carvalheiro, 1978). Alimentos e água contaminados com cistos são os meios mais freqüentes de veiculação desta protozoose. Vários surtos de giardíase que ocorreram no Canadá estavam associados à contaminação da água (Roach *et al.*, 1993).

Coutinho, 1960 refere ser a disseminação de *G. lamblia* relacionada a fatores epidemiológicos como água de beber e de uso doméstico, alimentos servidos crus, contato com manipuladores de alimentos, contato direto pessoa a pessoa, bem como fezes expostas e contato indireto com artrópodes domésticos, principalmente, baratas e moscas. É ainda possível que o protozoário *G. lamblia* tenha um potencial zoonótico de infecção e com características patogênicas de diferentes cepas, tendo grande importância epidemiológica e de saúde pública (Garcia *et al.*, 2002).

Com o processo de urbanização, o número de creches tem se expandido em todo o Brasil, inclusive em Maringá. Segundo Porcu & Watanabe (1998), a prevalência de enteroparasitas no município de Maringá/PR é de 23%, sendo 43% deste total de casos de *G. lamblia*.

Neste trabalho procurou-se avaliar a prevalência de giardíase em crianças com diferentes níveis cultural e sócio-econômico que freqüentam creches no município de Maringá, Paraná.

Recebido em 20/3/2004
Aprovado em 30/7/2004

¹Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

MATERIAL E MÉTODOS

• População alvo

Foram escolhidos três creches com diferentes níveis sócio-econômico e cultural da zona urbana de Maringá - PR. Considerou-se creche "A", localizada no campus universitário, 97 crianças matriculadas, com idade de 0 a 5 anos. São filhos de funcionários da Universidade Estadual de Maringá, recebem atenção na área de saúde, assistência social, contando com pediatra na instituição. As mães e seus filhos recebem continuamente noções básicas de higiene. A creche "B", localizada no bairro Parque das Grevíleas, 40 crianças matriculadas, com idade de 2 a 5 anos, provenientes de famílias com renda média de 3 a 5 salários mínimos. A creche "C", localizada no bairro Guaiaipó, 60 crianças matriculadas, com idade de 2 a 5 anos, cujas famílias possuíam renda de até 2 salários mínimos.

As creches "B" e "C" não contam com pediatra na instituição. Entretanto, recebem atenção da Unidade de Saúde do bairro.

As instituições são servidas por água encanada e tratada, fornecida pela companhia de saneamento - SANEPAR - Serviço de Abastecimento de Água do Paraná. O lixo é coletado regularmente pela Prefeitura Municipal (três vezes por semana).

Todas as mães trabalhavam em atividades diversas fora de seus lares. Deixavam seus filhos nas creches, onde permaneciam durante o período diurno, nos dias úteis, em regime de semi-internato, não se tratando assim de coletividade fechada.

• Ficha epidemiológica

Foi elaborado um questionário único, aplicado a cada família pesquisada, a fim de avaliar renda familiar, abastecimento de água, destino do lixo e dejetos, hábitos de ingerir hortaliças, local para dormir, presença de animais domésticos, preparo dos alimentos, higiene pessoal, doméstica e dos alimentos.

• Coleta de material

Foram coletadas três amostras de fezes de cada criança em dias alternados. As coletas eram feitas nas residências e nas creches sendo as mães e educadoras orientadas quanto aos cuidados na coleta e no acondicionamento das fezes.

Destas mesmas crianças foram coletadas as unhas para análise do extrato sub-ungueal.

• Análise laboratorial

As fezes coletadas eram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Básica, Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, para pesquisa de protozoários e helmintos.

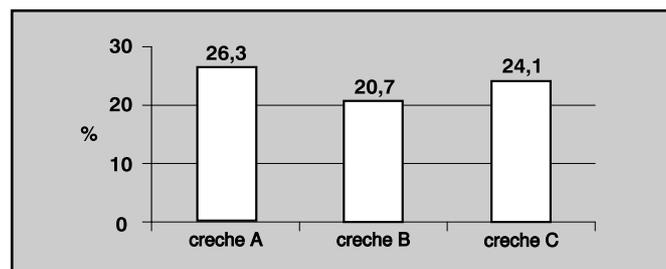


FIG. 1 - Prevalência de *Giardia lamblia* entre crianças de 0 a 5 anos, que freqüentam creches no município de Maringá - PR

tos. As técnicas utilizadas foram de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust, 1939) e sedimentação espontânea (Hoffmann, Pons & Janer, 1934).

Para pesquisa de parasitos no extrato sub-ungueal utilizou-se a metodologia descrita por Mello, 1978.

• Análise estatística

Os dados da ficha epidemiológica e dos exames parasitológicos de cada criança foram agrupados para cada creche. Para a análise estatística utilizou-se o teste do qui-quadrado com nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na creche "A" foram examinadas 80/97 (82,5%) crianças com idade de 0 a 5 anos, na creche "B", 29/40 (72,5%) crianças de 2 a 5 anos e na creche "C" 29/60 (48,3%) crianças de 2 a 5 anos. A prevalência de *G. lamblia* obtida para as três creches foi de 26,25%, 20,7% e 24,1%, respectivamente para as creches "A", "B" e "C" (Fig. 1), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas.

Na creche "A", 21 crianças apresentaram exames parasitológicos positivos sendo que a única espécie observada foi *G. lamblia* (26,3%). Na creche "B" foram identificadas 6 crianças parasitadas com *G. lamblia* (20,7%), sendo ainda observados os comensais *Entamoeba coli* (3,4%) e *Iodamoeba bustchlii* (3,4%). Na creche "C", além de *G. lamblia* (24,1%), foram diagnosticados *Enterobius vermicularis* (13,8%), *Endolimax nana* (6,9%) e *Entamoeba coli* (24,1%) (Tab. I).

O resultado de amostras positivas utilizando mais de uma amostra de fezes, coletadas em dias alternados, evidenciou maior sensibilidade para diagnosticar *G. lamblia* conforme mostra Tab. II.

Os exames parasitológicos de extrato sub-ungueal foram realizadas em 70 crianças da creche "A" com resultado positivo para *Endolimax nana* em 2 crianças (2,9%); na creche "B" foram realizados 14 exames com resultado negativo e na creche "C" 23 exames com resultado positivo para *Entamoeba coli* (8,7%) e *Endolimax nana* (8,7%), todos protozoários comensais, Tab. III.

Com relação ao item "água potável" todas as creches têm abastecimento público e usam filtragem para ingestão da mesma. Quanto aos aspectos destino adequado dos dejetos e do lixo é considerado adequado. Todas usam dormitório coletivo.

Considerando as creches A, B e C, 87,5%, 86% e 86% das crianças respectivamente, chegam em casa com unhas sujas e a maioria, 93,8%, 86% e 82,8%, respectivamente, corta as unhas semanalmente.

TABELA I
Prevalência de protozoários e helmintos em crianças de 3 creches no município de Maringá/PR

Espécie	Creche "A"		Creche "B"		Creche "C"	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Giardia lamblia</i>	21	26,3	06	20,7	07	24,1
<i>Entamoeba coli</i>	0	0	1	3,4	07	24,1
<i>Endolimax nana</i>	0	0	0	0	02	6,9
<i>Enterobius vermicularis</i>	0	0	0	0	04	13,8
<i>Iodamoeba butschlii</i>	0	0	01	3,4	0	0

TABELA II
Frequência de positividade para *Giardia lamblia*
em crianças de 0 a 5 anos, considerando a primeira, segunda
e terceira amostras de fezes coletadas
em dias alternados

Creche	1ª amostra		2ª amostra		3ª amostra		Total de positivos (%)
	nº de exames	nº de positivos	nº de exames	nº de positivos	nº de exames	nº de positivos	
"A"	80	14	32	6	9	1	21 (26,25)
"B"	29	3	10	5	5	1	6 (20,7)
"C"	29	3	11	3	6	1	7 (24,1)

TABELA III
Resultados dos exames parasitológicos de depósito subungueal

Espécie	Creche					
	"A" – 70 exames		"B" – 14 exames		"C" – 23 exames	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Endolimax nana</i>	2	2,9	0	0	2	8,7
<i>Entamoeba coli</i>	0	0	0	0	2	8,7

TABELA IV
Distribuição das frequências das crianças
segundo alguns aspectos epidemiológicos

Aspectos epidemiológicos	Creche A	Creche B	Creche C
Água potável filtrada	100%	100%	100%
Destino adequado dos dejetos	100%	100%	100%
Destino adequado do lixo	100%	100%	100%
Dormitório coletivo	100%	100%	100%
Chegam em casa com unha suja	87,5	86%	86%
Cortar as unhas semanalmente	93,8%	86%	82,8%

DISCUSSÃO

A prevalência de giardíase obtida nas três creches A, B e C foi respectivamente 26,25%, 20,7% e 24,1%, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas. A creche da UEM é constituída por filhos de professores e funcionários, há na instituição intenso trabalho de orientação quanto à promoção de saúde contemplando informações bastante diferenciadas. Ainda assim, os resultados revelaram que a prevalência de giardíase não sofreu influência do ponto de vista sócio-cultural, entre as creches analisadas. O elevado grau de parasitismo por *G. lamblia* em crianças que freqüentam creches com diferentes níveis sócio-econômicos de uma população foi verificado por diversos autores (Camello & Carvalho, 1990; Oliveira *et al.*, 1979; Florêncio, 1990).

A coleta de três amostras de fezes para o diagnóstico de giardíase, aumentou consideravelmente a positividade. Esse procedimento foi usado para diminuir a possibilidade de resultados falso-negativos, muito freqüentes em diagnóstico desta parasitose. Utilizando três amostras, considera-se os períodos negativos existentes durante a infecção da mesma.

O fato das creches utilizarem o processo de filtração da água eliminaria cistos de protozoários e ovos de helmintos. Portanto, por este veículo, dificilmente ocor-

reria a contaminação das crianças por enteroparasitas. Quanto ao uso de água filtrada nos domicílios das crianças, apesar de 100% das respostas serem afirmativas, acredita-se que por haver abastecimento público, há negligência e descuido com a ingestão de somente água filtrada.

Quanto às outras variáveis epidemiológicas, destino do lixo e dos dejetos as respostas incluíram coleta pela Prefeitura e a fossa sanitária. Estes destinos são considerados, não sendo possível avaliar-se o peridomicílio como fonte de infecção.

A transmissão da giardíase pessoa a pessoa poderia ser um importante fator a ser considerado, pois há em todas as creches dormitórios coletivos, e a contaminação oral-fecal se dá facilmente entre as crianças pré-escolares por desconhecerem os bons hábitos higiênicos. Estes dados podem ser reforçados pela análise do depósito sub-ungueal, esses resultados embora tenham evidenciado apenas alguns comensais, demonstra ser um veículo importante na transmissão de protozoários. O encontro de *Endolimax nana* e *Entamoeba coli* são indicadores de baixas condições de higiene e contaminação fecal. Cabe ressaltar ainda a ocorrência de *E. vermicularis* cuja metodologia utilizada para o diagnóstico não foi específica, mesmo assim teve alta positividade na creche "C" reforçando a transmissão de parasitoses intestinais de criança para criança em ambientes coletivos.

REFERÊNCIAS

- Bal D.G., Porter B.W., La giardiasis en las guarderías infantiles de Tucson, Arizona – EUA, Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 93:421-433, 1982.
- Black R.E., Dykes A. C., Sinclair S.P., Wells J.G. Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. Pediatrics 60:486-491, 1977.
- Camello J.M.A., Carvalho M.R.C. *Giardia lamblia* Stiles, 1915 em menores de 5 anos de idade: relação com condições de habitação. Revista de Patologia Tropical 19:127-133, 1990.
- Florêncio M.L.Q. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses em famílias da cidade de Pradópolis, São Paulo. Jornal de Pediatria 60:291-296, 1986.
- Marzochi M.C.A., Carneiro J.R. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. III – Distribuição de algumas enteroparasitoses em dois grupos populacionais da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical 20:31-35, 1978.
- Meyer E.A., Jarrol E.L. Reviews and commentary giardiasis. American Journal of Epidemiology 111:1-12, 1980.
- Oliveira T.B., Farraj M.B., Oliveira MNOM, Martucci N.C., Fortunato PA., Borges P.A.M., Motta P.C.V., Silva P.C.P., Barbieri P.H.P. Enteroparasitoses observadas em crianças que freqüentam uma creche de Ribeirão Preto. Medicina 10:7-10, 1979.
- Donald H., Medeiros Souza L.B., Lima Malta L.B. Atualização Terapêutica nas parasitoses intestinais no período infantil. Pediatria Moderna. Volume XXXV. Nº 9 – Setembro de 1999.
- Faust E.C. *et al.* Comparative efficiency of various techniques for the diagnoses of protozoa and helminthes in feces. Journal of Parasitology 25:241-262, 1939.
- Hoffmann W.A., Pons J.A., Janer J.L. The sedimentation – concentration method in *Schistosomiasis mansoni*, Puerto Rico. Journal Publ. Hlth, 9:281-298, 1934.
- Porcu M.L., Watanabe N. Estudo da prevalência de enteroparasitas no município de Maringá. 6ª Reunião Especial das SBPC, outubro de 1998 Maringá – Paraná.
- Garcia L.E., Galvan S.C., Jimenez Cardoso E. Phylogenetic distance between *Giardia intestinalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children. Rev Invest Clin 2002 Mar-Apr;54(2):113-8.
- Roach P.D., Olson M.E., Whitley G., Wallis PM. Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. Appl Environ Microbiol 1993 Jan;59(1):67-73.
- Westerhuis J.B., Mank T.G. Intestinal parasites in African asylum seekers: prevalence and risk. Factors. Ned Tijdschr Geneesk 2002 Aug 10;146(32):1497-501.

Endereço para correspondência
 Aurea Regina Telles Pupulin
 artpupulin@uem.br

Doença de Chagas em crianças no Estado do Paraná, Brasil

Chagas' disease in children from Paraná State, Brazil

Silvana Marques de Araújo¹, Mônica Lúcia Gomes¹, Mário Ortiz², Arnaldo Lima Costa³, Umberto Assis Membrive⁴, Max Jean de Ornelas Toledo¹ & Ana Lúcia Falavigna Guilherme¹

RESUMO – Este trabalho discute a importância do estado de alerta em relação à doença de Chagas no Estado do Paraná, Brasil, a partir do diagnóstico da doença em duas situações peculiares. Situação 1: criança do município de Roncador, 11 meses, apresentando edema bupalpebral unilateral e gripe forte. Hemocultura e PCR positivas. A experiência do médico obtida na Bolívia foi decisiva para o diagnóstico clínico/encaminhamento da criança. Situação 2: duas crianças do município de Ortigueira, 9 e 12 anos, sorologia e PCR positivas. A investigação iniciou-se após denúncia de que adultos de *Panstrongylus megistus* sugaram as crianças. Considerando que a situação da transmissão da doença de Chagas no Brasil está sob controle, estes casos ilustram o valor da experiência profissional e enfatizam a importância da manutenção da vigilância epidemiológica.

PALAVRAS-CHAVE – Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, caso agudo, vigilância epidemiológica, Estado do Paraná.

SUMMARY – This work describe the importance of being alert regarding Chagas disease in Paraná state, Brazil, considering the disease diagnosis in two peculiar situations. Situation 1: an 11 month old child from Roncador municipality, presenting one-sided eyelid edema and cold symptoms, positive haemoculture and PCR. The physician's experience obtained in Bolivia was decisive for both the clinical diagnosis and sequence of procedures. Situation 2: two children from Ortigueira municipality, 9 and 12 years old with positive serology and PCR. The investigation has begun after denouncing that adult *Panstrongylus megistus* had bitten the children. Considering that the situation of Chagas disease transmission in Brazil is under control, these cases illustrate the value of professional experience and point out the importance of epidemiologic surveillance maintenance.

KEYWORDS – Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, acute case, epidemiological surveillance, Paraná State.

INTRODUÇÃO

A transmissão da doença de Chagas declinou significativamente nos últimos trinta anos no Brasil e em grande parte da América Latina¹. No Brasil, dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) mostram que após 20 anos de controle químico continuado houve franca redução das taxas de infestação por triatomíneos, particularmente para as espécies *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*². Em paralelo, dados de sorologia escolar, de internações e de mortalidade pela doença indicam diminuição nas taxas de incidência e impacto médico social da protozoose, restando áreas mais preocupantes, como o nordeste brasileiro com resíduos de *Triatoma infestans*². Portanto, ainda é necessário uma vigilância epidemiológica efetiva a ser realizada por estados e municípios sobretudo se for considerado o processo de descentralização da FUNASA².

Segundo Dariush (1998)⁴ as ações de controle da doença de Chagas estão entre as que apresentam intervenções com alta efetividade. O controle triatomínico mostra-se de menor custo em relação aos gastos com a atenção ao paciente chagásico³. Uma análise recente do programa brasileiro de controle da doença de Chagas chegou à estimativa de que, entre 1975 e 1995, foram prevenidas 2.339.000 novas infecções pelo *Trypanosoma cruzi* e 337.000 óbitos³. Esses números indi-

cam economia de gastos da ordem de US\$ 17,00 para cada US\$ 1,00 aplicado nas atividades de controle.

Um grande desafio que o atual estágio de controle da doença de Chagas determina, é sem dúvida a instituição de um sistema de vigilância operante que revele de forma rápida casos esporádicos de transmissão. Estes devem ser tratados de forma diferenciada, exigindo conhecimento técnico, destreza e rapidez tanto no diagnóstico clínico e laboratorial quanto no seu encaminhamento e acompanhamento pelo sistema de saúde local.

Este trabalho tem como objetivo discutir a importância de manter as autoridades de saúde em estado de alerta para com a doença de Chagas no Estado do Paraná, frente às peculiaridades de três casos da doença diagnosticados em crianças menores de 14 anos de idade, em um espaço de 2 anos.

Descrição das situações

Situação 1: criança do sexo feminino, 11 meses de idade, residente na periferia da cidade de Roncador, PR, Brasil, com suspeita clínica de infecção pelo *T. cruzi*. A anamnese foi feita por um clínico geral que registrou no prontuário médico a observação de "edema bupalpebral unilateral e síndrome gripal". A mãe relata que neste mesmo período a criança apresentou gripe forte e a formação de uma bolha no local da picada de

Recebido em 1/4/2004
Aprovado em 28/7/2004

¹UEM, Maringá - PR; ²Sec. Munic. de Saúde de Roncador; ³FUNASA/Maringá - PR; ⁴Lab. de Entomologia e Parasitologia Méd., Arapongas - PR

um inseto que ela denominou "borrachudo". A criança nunca sofreu transfusão sanguínea. A pedido médico, um mês após a suspeita clínica foram realizados exames parasitológicos direto a fresco, gota espessa e hemocultura⁵. Foram ainda realizados pela Universidade Estadual de Maringá os testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI) (Biolab), ensaio imunoenzimático (Elisa/Abbott) e Elisa com antígeno CRA/FRA (Bio-Manguinhos/Fiocruz) para pesquisa de IgG e a reação em cadeia da polimerase (PCR)⁶. Dos testes acima mencionados somente a hemocultura e a PCR, após hibridização, apresentaram resultado positivo para *T. cruzi*. Frente às peculiaridades do caso, foram avaliadas e descartadas todas as possibilidades de erros de diagnóstico. A cepa do parasita foi isolada, seu DNA extraído e um fragmento de 330 pares de base (específico para *Trypanosoma cruzi*) foi amplificado pela PCR, confirmando tratar-se da espécie *Trypanosoma cruzi*.

Para melhor investigação do caso, após o diagnóstico laboratorial positivo da criança, foi realizada a sorologia (IFI, Elisa) de toda a família, incluindo nova amostra da criança infectada. Todos os testes foram negativos.

Foi sugerido o tratamento etiológico da criança com benznidazol (Rochagan - Roche) na dose de 9-10 mg/kg de peso por 60 dias consecutivos⁷, sob estrito controle médico. Frente às condições de higiene e alimentação da família e considerando os efeitos colaterais do fármaco, foi sugerido que a administração do medicamento ficasse a cargo de um agente comunitário da Secretaria Municipal de Saúde de Roncador, e que durante o tratamento a criança permanecesse na creche municipal. A criança apresentou dermatite como reação adversa ao benznidazol. Oito, 20 e 41 meses após o tratamento foram feitas novas coletas de sangue para realização de hemocultura, IFI, Elisa e a PCR que apresentaram resultados negativos. O controle de cura deverá ser realizado até 60 meses após o tratamento, segundo protocolo estabelecido pelo Laboratório de Doença de Chagas/UEM.

A investigação epidemiológica revelou que a casa onde a criança supostamente poderia ter sido infectada localizava-se a 500 metros de distância da área silvestre e foi destruída. A visita a este local não revelou presença de triatomíneos nem de seus vestígios. A fala da vizinhança também é incompatível com a presença destes insetos. A instabilidade e o grau de pobreza da família pode ser avaliado pelo fato da atual residência ser a terceira moradia dessa família em cinco meses e a mãe da criança frequentar o "lixão" do município. A situação como um todo revelou miserabilidade sem qualquer condição de higiene, baixa auto-estima, sendo a família classificada pelo serviço municipal de saúde e social como "uma família problema".

Situação 2: duas crianças do sexo masculino, 9 e 12 anos de idade, procedentes da zona rural do município de Ortigueira, PR, Brasil. A investigação teve início a partir do envio de três exemplares adultos de *P. megistus*, dois machos e uma fêmea, ao Laboratório de Entomologia e Parasitologia Médica de Arapongas/PR (LEPMAR). A mãe relatou que as crianças foram picadas pelos insetos, os quais não foram examinados quanto a presença de flagelados tipo *T. cruzi* por estarem mortos. A família relatou ainda que abandonou a casa onde vivia por se sentir incomodada pelas picadas do "bicho barbeiro". A nova casa, também uma tapera às margens do "Rio do Peixe", é circundada por lajedos

com vegetação rala e arbustiva e dista 400 metros da casa antiga. Esta última foi destruída, restando apenas pequena estrutura que foi vistoriada pelos técnicos do LEPMAR. Não foram encontrados triatomíneos ou seus vestígios neste local ou em seus arredores.

Tanto as crianças quanto sua família foram encaminhadas ao serviço de saúde municipal de Ortigueira. Foi coletado sangue dos oito membros da família para realização dos testes de IFI, Elisa, hemocultura e PCR. Apenas as duas crianças apresentaram resultados da IFI, Elisa e PCR positivos. A hemocultura foi negativa para todos os membros da família.

As crianças foram encaminhadas ao clínico geral que seguindo orientação dos docentes do Laboratório de Doença de Chagas/UEM, solicitou a realização do eletrocardiograma, raio X de tórax e hemograma antes de indicar o tratamento etiológico. As crianças foram tratadas com benznidazol (Rochagan - Roche) na dose de 9-10mg/kg de peso⁷. A pedido do clínico, o medicamento foi administrado sob a responsabilidade da escola em que as crianças estudavam, garantindo assim a continuidade do tratamento em condições adequadas de alimentação. Após 60 dias de tratamento foi realizado novo hemograma. Doze meses após o tratamento os resultados da IFI e Elisa permaneceram positivos sendo a PCR e a hemocultura negativas. O controle de cura deverá ser realizado até 60 meses após o tratamento, segundo protocolo estabelecido pelo Laboratório de Doença de Chagas/UEM.

DISCUSSÃO

A prevalência para doença de Chagas no Estado do Paraná foi de 4,0% segundo o Inquérito Nacional de 1980⁸. Com base nesta prevalência, Silveira & Resende (1994)⁹, estimaram em 166.511 o número de casos positivos de doença de Chagas para este Estado com população rural de 4.164.943 de habitantes.

Até 1996 os dados referentes ao encontro de triatomíneos no Estado do Paraná podem ser resumidos em algumas poucas referências^{10,11,12,13,14}. Segundo a FUNASA/PR a espécie *T. infestans* foi encontrada pela última vez neste estado, em 1991. Com relação às espécies *P. megistus* e *Triatoma sordida*, embora Silveira & Vinhaes (1998)¹⁵ não tenham relatado o encontro destas espécies no Paraná entre os anos de 1995 a 1997, outros autores¹⁶ observaram que *T. sordida* foi a espécie mais coletada em peridomicílios rurais no noroeste deste estado. Pesquisas recentes^{17,18} verificaram que 12,7% das unidades domiciliares rurais no noroeste do Estado do Paraná, tanto habitadas quanto desabitadas, apresentavam-se infestadas por ninfas e adultos de *T. sordida*, de *P. megistus*, onde 13,5% destes exemplares estavam infectados por *T. cruzi*. Esses autores verificaram grande desinteresse por parte dos moradores com relação a estes achados. Da mesma forma, observaram que os profissionais de saúde nos municípios incluídos no estudo, quase sempre não orientavam adequadamente solicitações da comunidade sobre como e a quem encaminhar denúncias de triatomíneos.

A população rural residente em Roncador (50%) e Ortigueira (66%) é expressiva e devido a grande extensão territorial e baixa condição sócio-econômica dos moradores, há dificuldade de acesso a todos os serviços disponibilizados na área urbana. Em 1998, o município de Roncador não estava listado entre as priorida-

des do planejamento do Programa de Controle da Doença de Chagas/FUNASA enquanto o município de Ortigueira foi considerado Prioridade I. A Programação Pactuada Integrada de 2002 não apresenta meta para o estado do Paraná com relação à vigilância entomológica de triatomíneos.

Considerando a atual situação de controle vetorial da Doença de Chagas no Brasil e o fato desses casos terem ocorrido em um estado onde *a priori* não se esperaria transmissão ativa, o caso 1 só foi diagnosticado tendo em vista a competência técnica do médico, um profissional que teve larga experiência no diagnóstico de casos agudos da Doença de Chagas na Bolívia, transitoriamente prestando serviços no Brasil. Frente a uma suspeita clínica bem fundamentada de doença de Chagas aguda, buscou os serviços do Laboratório de Doença de Chagas/UEM onde técnicas adequadas para o diagnóstico laboratorial pudessem ser realizadas. Quando da solicitação destes exames, acrescentou comentários quanto à possibilidade de resultados negativos nos testes sorológicos, reforçando a importância de testes parasitológicos. Este fato ilustra o valor da experiência prática e a importância de estar alerta com relação ao diagnóstico de casos recentes nessa região. Por outro lado levanta a discussão da permanente vigilância epidemiológica, uma vez que a condição dessa família é a mesma de mais ou menos 30% da população de Roncador. Segundo dados da FUNASA, este município está em uma área de *P. megistus* e a última vistoria neste município foi em 1984.

Importante não perder de vista a necessidade de se intervir rapidamente nestas situações, considerando os bons índices de cura obtidos tanto no tratamento etiológico da fase aguda¹⁹ quanto da fase crônica recente²⁰. No caso 1, não fossem as suas peculiaridades de diagnóstico já relatadas, possivelmente a fase aguda desta criança não seria diagnosticada e evoluiria para a fase crônica, podendo desenvolver sintomatologia. Deve-se considerar ainda o risco de transmissão congênita ou mesmo desta pessoa vir a descobrir a infecção numa época tardia de sua vida quando as providências de intervenção disponíveis mostrariam menor chance de eficácia.

Frente às características do caso 2, a questão da vigilância epidemiológica no Paraná deve ser novamente mencionada. Embora o caso tenha sido diagnosticado a partir de uma denúncia, não se pode afirmar que a infecção dessas crianças seja proveniente dos exemplares de triatomíneos aportados pela mãe ao posto de saúde. Deve-se considerar ainda que a situação de infestação por triatomíneos das unidades domiciliares no município de Ortigueira não está esclarecida, e que no município vizinho, Rosário do Ivaí, em menos de duas horas de inspeção em duas unidades domiciliares, verificamos a presença de ninfas de *P. megistus*.

Os resultados obtidos pelo Programa de Controle da Doença de Chagas permitiram incluir esta doença no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (Portaria do MS nº 1.100 de 23 de maio de 1996). Entre os objetivos desta vigilância está o de detectar casos agudos adotando medidas de controle adequadas, a continuidade do controle de vetores domiciliares onde a vigilância entomológica deve ser exercida pela população, de forma contínua e controlada pela rede de serviços de saúde. É preciso lembrar que casos agudos devem ser notificados à equipe de vigilância mais próxima do local de ocorrência da transmissão. Além disso,

para se ter conhecimento da magnitude da doença e das áreas de transmissão ativa, inquéritos sorológicos amostrais devem ser realizados²¹.

O estado de alerta é recomendado mesmo nos Estados que já possuem certificação de "eliminação da transmissão vetorial da doença", a exemplo de Minas Gerais²². Segundo Dias (2001)²² circunstancialmente, a principal instituição de combate ao "barbeiro" no país, a Fundação Nacional de Saúde, retira-se de cena em nome de uma descentralização pactuada, município-estado-federação. Frente aos "barbeiros", o desafio presente é de permanente vigilância, para que não volte o principal transmissor ou outras espécies silvestres. Este trabalho é simples e pode ser desenvolvido pelos municípios. O problema é a coordenação e supervisão, papel que cabe ao Estado.

Esses dados mostram a necessidade de uma investigação mais apurada com relação a situação atual de transmissão da doença de Chagas no Estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

1. Gazin P., Melo G., Albuquerque A. & Oliveira Jr.W. Atualidade da doença de Chagas numa área rural do nordeste do Brasil. *França-Flash*, 20:1-4, 1999.
2. Vinhaes M.C. & Dias J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(2):7-12, 2000.
3. Silveira A.C. Situação do Controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(2):35-42, 2000.
4. Dariush A. Análise de Curso-Efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil: Relatório Final. Brasília: Organização Panamericana da Saúde, 1998.
5. Chiari E., Dias J.C.P., Lana M., Chiari C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22:19-23, 1989.
6. Gomes M.L., Macedo A.M., Vago A.R., Pena S.D.J., Galvão L.M.C., Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polimerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, 88:28-33, 1998.
7. FUNASA. Manejo Clínico em Doença de Chagas/elaborado por Antônio Luiz Pinheiro Ribeiro...[et al]/organizado por Eliane Dias Gontijo e Manoel Otávio da Costa Rocha - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1998, 149p.
8. Camargo M.E., Silva G.R., Castilho E.A., Silveira A.C. Inquérito sorológico da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 26:192-204, 1984.
9. Silveira A.C., Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27(supl III):11-22, 1994.
10. Simões A. J.P. Doença de Chagas no estado do Paraná, Brasil. *Esboço epidemiológico. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 39:279-290, 1943.
11. Almeida A.S. Doença de Chagas no norte do Paraná. *An Paul Med Cirurg* 56:219-236, 1948.
12. Lobo A.G.S., Borba A.M. & Souza J. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos triatomíneos domiciliários e seus índices de infecção natural pelo *Schizotrypanum cruzi* no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 6:571-584, 1953.
13. Souza-Araújo H.C. A doença de chagas no Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 52, 477-485, 1954.
14. Silveira A.C., Feitosa, V.R., & Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 36: 15-312, 1984.
15. Silveira A.C., Vinhaes M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31(supl II): 15-60, 1998.
16. Toledo M.J.O., Kühl J.B., Silva S.V., Gasperi M.V. & Araújo S.M. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, sul do Brasil. *Resultados preliminares. Revista do Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 197-203, 1997.
17. Guilherme A.L.F., Pavanelli G.C., Silva S.V., Costa A.L., Araújo S.M. Secondary triatomine species in dwellings and other nearby structures in municipalities under epidemiological surveillance in the state of Paraná, Brazil. *Revista Panam Salud Publica* (Panam. J. Public Health), 9(6):385-392, 2001.
18. Guilherme A. L.F., Costa A.L., Batista O., Pavanelli G.C., Araújo, S.M. Atividades educativas para o controle de triatomíneos em área de vigilância epidemiológica do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(6):1543-1550, 2002.
19. Cançado J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benzimidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 44(1):29-37, 2002.
20. Andrade A., Zicker F., Oliveira R., Silva S., Luquetti A.O., Travassos L., Almeida I., Andrade S., Andrade J. & Martelli C. Randomised trial of efficacy of benzimidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, 348, 1407-1413, 1996.
21. FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Doença de Chagas: Aspectos Epidemiológicos, 2002. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0507.pdf>>2002.
22. Dias J.C.P. A doença de chagas em Minas. *Jornal Informativo da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Ano V, nº. 11, Jul/Set, 2001.

Endereço para correspondência

Profª Silvana Marques de Araújo

Parasitologia Básica/Univ. Est. de Maringá

Av. Colombo, 5790 - CP 331 - Maringá - PR - 87020-900 - Fax: (0xx44)261-4490

E-mail: smaraujo@uem.br

Programa de Controle da Qualidade externo em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e Região Metropolitana, PR*

External Quality Control Program in hematology: interlaboratory variability for red blood cell and platelets values in Curitiba and Metropolitan Area, PR., Brazil

Aline Borsato Hauser¹, Caroline Luise Prochaska², Aguinaldo José do Nascimento³ & Maria Suely Soares Leonart⁴

RESUMO – A padronização e o controle de qualidade representam elementos imprescindíveis para a rotina laboratorial. Este projeto teve como objetivo analisar a variabilidade interlaboratorial, a partir da distribuição de amostras preservadas para os valores do eritrograma e contagem de plaquetas. Foram preparadas amostras estáveis para eritrograma e contagem de plaquetas, a partir de unidades de sangue venoso de 3 doadores, coletadas no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR. Os eritrócitos e as plaquetas foram isolados e ressuspensos em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído (Leonart *et al.* Rev.Bras.Anál.Clin. 21:111, 1989; Emendörfer *et al.*, Rev.Bras.Anál.Clin. 32:191, 2000), para amostras controle altas, médias e baixas. Distribuiu-se alíquotas a 14 Laboratórios de Análises Clínicas de Curitiba e Região Metropolitana, que determinaram os valores do eritrograma e plaquetas, semanalmente, empregando os equipamentos T890 e STKS (Coulter), Cell Dyn 1400, 1700 e 3500 (Abbott), ou Sysmex (Roche). Verificou-se o desempenho dos laboratórios por meio dos gráficos de controle de qualidade, determinando-se a frequência de resultados fora dos limites controle. Observou-se menor ocorrência fora desses limites para os laboratórios que realizavam controle de qualidade externo e interno, e uma correlação aceitável entre os resultados obtidos com os equipamentos empregados. Tais resultados incentivam a utilização de sistemas de qualidade para assegurar a padronização das técnicas e garantir o controle de qualidade nos Laboratórios de Análises Clínicas.

PALAVRAS-CHAVE – Controle de qualidade em hematologia, preservação de eritrócitos, preservação de plaquetas.

SUMMARY – Standardization and Quality Control in Clinical Laboratories are relevant and increase the probability of obtaining adequate results for the diagnosis. The aim of this work was to analyze the possible interlaboratorial variations, using stable control samples for the red cells values and platelets. Stable samples were prepared from 3 healthy donors' venous blood. The blood samples were collected at the Blood Bank of the Hospital de Clínicas, UFPR. The isolated red cells and platelets were partially fixed with glutaraldehyde (Leonart *et al.* Rev.Bras.Anál.Clin. 21:111, 1989; Emendörfer *et al.* Rev.Bras.Anál.Clin. 32:191, 2000), and resuspended in CE solution to high, medium, and low control samples. Aliquots of the samples were distributed to the 14 Clinical Laboratories in Curitiba and Metropolitan Area, PR., Brazil, that weekly determined the red cell values and platelets, using automated equipments T890 and STKS (Coulter), Cell Dyn 1400, 1700 and 3500 (Abbott), or Sysmex (Roche). The performance of the laboratories was analyzed by means of the quality control charts observing the frequency the laboratories and the equipments presented results out of the control limits. Minimum occurrences were observed with laboratories that accomplish external and internal quality control programs. We expect that the obtained results can motivate the use of quality systems to assure the standardization of the techniques and to guarantee the quality control in the Clinical Laboratories.

KEYWORDS – Quality control in hematology, red blood cell preservations, platelet preservations.

INTRODUÇÃO

O controle do erro é imprescindível em laboratório. Como não é possível eliminá-lo totalmente, é importante assegurar que a variabilidade se mantenha dentro de limites permitidos para cada metodologia (Henry *et al.* 1980).

O setor de hematologia é parte integrante e relevante do laboratório, por levar a decisões críticas na intervenção terapêutica. Esse fato acarreta elevado nível de responsabilidade do laboratório no sentido de assegurar a qualidade de suas análises, incluindo a

exatidão e a reprodutibilidade dos resultados (Stiene-Martin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998).

As medidas de controle de qualidade interno e externo consistem na monitoração da aparelhagem e do material do laboratório, através de amostras controle com resultados conhecidos, amostras replicadas sem conhecimento dos técnicos, avaliação dos métodos empregados, correlação entre dados clínicos e laboratoriais, bem como na troca de amostras entre laboratórios (Braga *et al.*, 1990; Leonart, 1994; Dacie & Lewis, 1995; Stiene-Martin *et al.*, 1998).

Para alcançar a qualidade nos laboratórios, são mui-

Recebido em 09/4/2003
Aprovado em 29/1/2004

*Trabalho realizado como parte de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, Curitiba - PR

¹Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Farmacêutica Bioquímica do Laboratório Frischmann-Aisengart, Curitiba-PR;

²Bolsista do Programa PIBIC CNPq/UFPR, Acadêmica do Curso de Farmácia; ³Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica;

⁴Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da UFPR. msue@ufpr.br / Apoio: UFPR, Fundação Araucária, CNPq e CAPES

tas as tarefas a serem realizadas, desde treinamento do pessoal envolvido, planejamento, escolha de materiais e reagentes químicos, padronização de técnicas, calibração de equipamentos, incluindo tomadas de decisão que podem acarretar uma melhor ou pior qualidade de cada procedimento. A obtenção de amostras de eritrócitos e de plaquetas preservadas é importante para a validação de técnicas e para verificar a reprodutibilidade dos resultados liberados pelos equipamentos hematológicos automatizados, tanto quanto a análise dos dados obtidos pelos laboratórios que utilizaram tais amostras (Stiene-Martin *et al.*, 1998).

Os propósitos de um programa de controle de qualidade externo não podem ser esquecidos na rotina laboratorial, e incluem manter a qualidade do desempenho analítico do laboratório participante, estabelecer as variações intra e interlaboratoriais; bem como estabelecer a correlação entre reagentes comerciais, instrumentos analíticos, procedimentos de calibração, procedimentos analíticos e resultados analíticos. (Aronson *et al.*, 1978).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a padronização e o controle de qualidade em hematologia, através do estudo de variações interlaboratoriais em 14 Laboratórios de Análises Clínicas em Curitiba e Região Metropolitana - PR, na análise de amostras controle estáveis para os valores do eritrograma e contagem de plaquetas, bem como correlacionar os dados obtidos com o emprego de programas de controle de qualidade interno ou externo, e com modelos e marcas de equipamentos empregados.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC - UFPR). Após consentimento informado, coletou-se 3 unidades de sangue venoso, de doadores voluntários, no Banco de Sangue do HC - UFPR, segundo as Normas Técnicas para coleta de sangue em Hemocentros, preconizadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), portaria nº 2.135 (Brasil, 2003) (Fig. 1).

Acondicionou-se as amostras em bolsas triplas (Gri-fols), num sistema fechado, com uma bolsa mãe constituída de cloreto de polivinil (PVC), com citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA1) e duas bolsas satélites, uma de PVC e a outra de material plastificante tri-2-etilxil-trimelitato (TOTM), para preservação de plaquetas. Centrifugou-se as bolsas (centrífuga refrigerada Sorvall RC-3B), durante 6 min a 600xg, transferindo-se o plasma rico em plaquetas para a bolsa TOTM, e mantendo-se o concentrado de eritrócitos na bolsa mãe. Removeu-se os leucócitos do plasma rico em plaquetas (Bio P Plus Biofil) e do concentrado de eritrócitos (R-500 II Sepacell Baxter), filtrando-se durante cerca de 20 min. Submeteu-se o material empregado para o preparo das amostras à lavagem em Extran neutro (Merck) e a sucessivos enxágües em água destilada-deionizada, para evitar contaminações mínimas por metais pesados, autoclavando-o (Grimes, 1980; Leonart *et al.*, 1986). Preparou-se o meio CE (Leonart *et al.*, 1986) para a preservação de eritrócitos e de plaquetas, com água do tipo I (Elga Maxima Ultra Pure Water), tinalizando-o a 65°C antes do uso. Fixou-se parcialmente os eritrócitos e as plaquetas com glutaraldeído em meio CE, diluindo-se as suspensões de células no meio na proporção de 1:2, e homogeneizando-se as amostras durante 1h (homogei-

nizador Melco LPR-3A) (Leonart *et al.*, 1989). Os procedimentos em sistema aberto foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Centrifugou-se as amostras de eritrócitos a 600xg durante 20min. Retirou-se o meio CE sobrenadante com extrator de plasma (Hemoblu), ressuspendendo-se os eritrócitos em meio CE, em frascos plásticos estéreis de 100ml para: amostras controle altas - 70ml de eritrócitos e 20ml de meio CE; amostras controle médias - 50 ml de eritrócitos e 40 ml de meio CE e amostras controle baixas - 30ml de eritrócitos e 60ml de meio CE, para VG de 60%, 45% e 25%, respectivamente.

Centrifugou-se as amostras de plaquetas a 2250xg durante 10 min, retirando-se o meio CE sobrenadante. Adicionou-se o sedimento de plaquetas ao meio CE em frascos plásticos estéreis de 100ml para amostras controle altas - 15ml de plaquetas e 35ml do meio CE e amostras controle médias - 5ml de plaquetas e 45ml do meio CE.

Realizou-se o controle microbiológico das amostras, semeando-as em meio Brain Heart Infusion (BHI) para hemocultura, não se observando crescimento bacteriano.

Homogeneizou-se as suspensões de eritrócitos e de plaquetas, fracionando-as em alíquotas de 2ml, acondicionado-as em frascos plásticos, mantidos a 4°C. Distribuiu-se as amostras preservadas a 14 laboratórios de análises clínicas, com orientações pertinentes ao manuseio das mesmas. Aplicou-se um instrumento de avaliação aos laboratórios participantes para se obter informações sobre participação em programas de controle de qualidade externo, desenvolvimento de programas de controle de qualidade interno, certificação e modelos e marcas de equipamentos utilizados.

Em cada laboratório determinou-se a contagem de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$), a concentração de hemoglobina (g/dl), os valores do VCM (fl), do HCM (pg), do CHCM (g/dl), do VG (%) e a contagem de plaquetas; durante 11 semanas, empregando os equipamentos: T890 e STKS (Coulter), Cell Dyn 1400, 1700 e 3500 (Abbott), ou Sysmex (Roche).

Analisou-se os valores hematimétricos obtidos pelos gráficos de Levey-Jennings (Shainin & Shainin, 1993), para cada uma das variáveis analisadas e para amostras controle altas, médias e baixas. Comparou-se o equipamento Cell Dyn 3500 (Abbott) em relação aos demais equipamentos pela análise de regressão. Analisou-se os dados com o pacote estatístico para microcomputadores pessoais "Statistica 5.0, StatSoft" (Vieira, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se analisar o desempenho dos laboratórios pelos gráficos de controle de qualidade de Levey-Jennings, observou-se que a maioria dos laboratórios apresentou resultados hematimétricos entre os limites superiores e inferiores de controle. Na Fig. 1, estão ilustrados os valores médios obtidos para o número de eritrócitos nas amostras controle médias. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para cada laboratório foram baixos na sua maioria, e variaram de 4,54 a 9,96% para eritrócitos, de 4,53 a 10,83% para hemoglobina, de 1,15 a 5,30% para VCM, de 1,01 a 6,61% para HCM, de 1,66 a 7,06% para CHCM, de 4,56 a 9,85% para VG e de 2,46 a 25,23% para plaquetas. O *Clinical Laboratory Improvement Amendment* de 1988 (CLIA 88) considera aceitáveis para determinações hematimétricas por equipamentos hematológicos automatizados os seguintes CV: 6% para eritrócitos, 7% para hemoglobina e 25% para plaquetas (Ferreira *et al.*, 2002). Para Dacie & Lewis

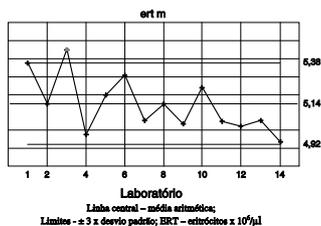


FIG. 1 - Gráfico de Controle de Qualidade para as médias de Ert por 14 laboratórios em Curitiba e Região Metropolitana - PR.

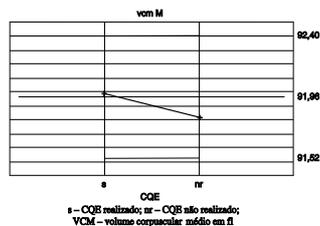


FIG. 2 - Gráfico de Controle de Qualidade para as médias de VCM, agrupadas conforme a participação em programas de Controle de Qualidade Externo (CQE), por 14 laboratórios em Curitiba e Região Metropolitana - PR.

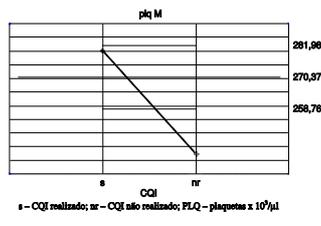


FIG. 3 - Gráfico de Controle de Qualidade para as médias de PLQ, agrupadas conforme a realização de Controle de Qualidade Interno (CQI), por 14 laboratórios em Curitiba e Região Metropolitana - PR.

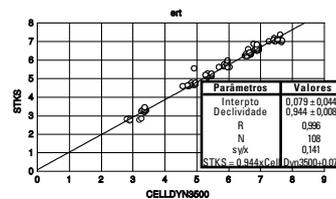


FIG. 4 - Comparação entre os equipamentos CELL DYN 3500 (Abbott) E STKS (Coulter) para medidas de Ert.

TABELA I

Classificação dos 14 laboratórios a partir do número de ocorrências fora dos limites controle para as médias de valores hematimétricos para as amostras controle altas, baixas e médias

Laboratórios	a	b	m	nº de ocorrências	f (%)
5	1	0	0	1	5,0
7	1	2	2	5	25,0
9	2	2	1	5	25,0
2	2	2	2	6	30,0
10	2	2	2	6	30,0
8	3	2	2	7	35,0
11	4	0	3	7	35,0
13	4	2	2	8	40,0
6	5	2	2	9	45,0
4	4	4	2	10	50,0
12	5	3	4	12	60,0
1	5	5	4	14	70,0
3	6	5	4	15	75,0
14	6	4	5	15	75,0

a - controle alto; b - controle baixo; m - controle médio; f (%) - frequência das ocorrências em percentagem

TABELA II

Classificação dos equipamentos pelo número de ocorrências de médias de valores hematimétricos de amostras controle altas, baixas e médias fora dos limites controle para cada equipamento

Equipamentos	a	b	m	nº de Ocorrências	f (%)
STKS	2	1	0	3	15,0
Cell Dyn1400	3	2	3	8	40,0
Systemex	3	3	2	8	40,0
Cell Dyn1700	5	2	3	10	50,0
T 890	5	4	5	14	70,0
Cell Dyn3500	6	5	5	16	80,0

a - controle alto; b - controle baixo; m - controle médio; f (%) - frequência das ocorrências em percentagem

QUADRO 1

Dados obtidos por meio de instrumento de avaliação sobre a participação em programas de CQ, a certificação e modelos e marcas de equipamentos automatizados de hematologia de 14 laboratórios em Curitiba e Região Metropolitana - PR

Laboratório	CQE	CQI	Certificação	Equipamento
1	SBPC	r	nc	Cell Dyn 3500 (Abbott)
2	SBPC	r	c	Cell Dyn 1400 (Abbott)
3	SBPC	r	c	Cell Dyn 3500 (Abbott)
4	SBPC	r	nc	T 890 (Coulter)
5	SBAC	r	nc	STKS (Coulter)
6	SBAC	r	nc	Cell Dyn 1400 (Abbott)
7	SBPC	nr	nc	Cell Dyn 1400 (Abbott)
8	SBPC CAP	r	c	Systemex (Roche)
9	nr	nr	nc	T 890 (Coulter)
10	SBAC	r	nc	Cell Dyn 1400 (Abbott)
11	SBPC	r	nc	Cell Dyn 1700 (Abbott)
12	SBAC	r	nc	Cell Dyn 1400 (Abbott)
13	SBAC	r	nc	Cell Dyn 1400 (Abbott)
14	nr	nr	nc	T 890 (Coulter)

r - realizado; nr - não realizado; c - certificado; nc - não certificado; CQE - Controle de Qualidade Externo; CQI - Controle de Qualidade Interno; SBPC - Sociedade Brasileira de Patologia Clínica; SBAC - Sociedade Brasileira de Análises Clínicas; CAP - College of American Pathologists

(1995), os limites de aceitabilidade para o CV são: 3-4 % para eritrócitos e hemoglobina, 4-5% para VG, VCM, HCM e CHCM, e 10-15% para plaquetas. Os CV obtidos para este trabalho podem ser considerados aceitáveis, ao se considerar que foram resultados obtidos em amostras preservadas ao longo do tempo, em diversos laboratórios, com variações na metodologia empregada.

Os CV mais elevados para a contagem de plaquetas são condizentes com dados obtidos por outros autores e podem ser explicados pelo maior número de variáveis sobre a precisão da contagem de plaquetas, como, por exemplo, a variação do tamanho das plaquetas, o satelitismo plaquetário ou a presença de agregados plaquetários, de fragmentos de leucócitos ou eritrócitos ou mesmo de partículas estranhas (Bick, 1993; Mckensie, 1996; Lee *et al.*, 1999).

Levantamentos de resultados de laboratórios são fatores determinantes para a manutenção da qualidade, conforme os dados obtidos na Noruega (Thue *et al.*, 2001), Formosa (Hsu *et al.*, 2000), Coréia do Sul (Cho, 1999), Europa (Libeer, 2001), Japão (Osawa, 2001), Tailândia (Oparkitattikul & Bejrachandra, 2002), Indonésia (Timan *et al.*, 2002) e Nepal (Sah *et al.*, 1999). Esses levantamentos foram realizados com um grande número de laboratórios e incluíram a área de hematologia, empregando como metodologia na avaliação dos resultados, as médias obtidas por todos os laboratórios, independentemente da metodologia empregada.

No Nepal, detectou-se variações entre os resultados com erros manuais, de calibração de equipamentos e diferenças significativas entre os citologistas dos di-

versos laboratórios participantes para os serviços de hematologia (Sah *et al.*, 1999). Na Indonésia, profissionais de laboratórios com desempenho pobre nos levantamentos realizados, participaram de treinamentos conduzidos pelo Laboratório Central de Saúde do país, cuja participação foi obrigatória para a obtenção da licença laboratorial (Timan *et al.*, 2002).

Tatsumi (2001) relatou que países da Ásia, como o Japão, basearam a padronização de suas técnicas na área de hematologia nas recomendações do Comitê Internacional de Padronização em Hematologia (ICSH). Fink *et al.* (1997), durante o XI Congresso Latino-americano de Bioquímica Clínica, realizado no México em 1993, com a participação de Cuba, Argentina, Chile, México, Paraguai, República Dominicana e Uruguai; observaram que CV obtidos na América Latina para eritrócitos (11%) e VG (4,5%), foram maiores que os obtidos na Europa e nos Estados Unidos da América, concluindo sobre a necessidade de melhorias no controle de qualidade para aqueles países.

Como se pode observar no Quadro 1, dos 14 laboratórios estudados, 12 participavam de programas de controle de qualidade externos, incluindo os desenvolvidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC) e Colégio Americano de Patologistas (CAP). Os laboratórios que realizavam controle de qualidade externo ou interno apresentaram, na sua maioria, valores dentro dos limites de controle, para as amostras controle altas, baixas e médias. Na Fig. 2 estão ilustrados os resultados médios obtidos para amostras controle médias para o VCM em função do emprego de controle

de qualidade externo e, na Fig. 3, os resultados médios obtidos para as amostras controle médias para o número de plaquetas em função do emprego de controle de qualidade interno.

A Tab. I mostra a classificação dos 14 laboratórios a partir do número de ocorrências fora dos limites controle, para as médias de valores hematimétricos para as amostras controle altas, baixas e médias. Pelos exemplos mostrados nas Fig. 2 e 3, e pela análise do Quadro I e da Tab. I, pode-se observar a relevância do emprego de controle de qualidade interno e externo para a diminuição da variabilidade dos resultados.

O estudo comparativo entre o equipamento Cell Dyn 3500 (Abbott) e os demais equipamentos T890 e STKS (Coulter), Cell Dyn 1400 e 1700 (Abbott) e Sysmex (Roche) para as medidas de ERT, foi realizado pela análise de regressão. A Fig. 4 mostra a comparação do equipamento Cell Dyn 3500 (Abbott) em relação ao STKS (Coulter), Cell Dyn 1700 (Abbott) e Sysmex (Roche), para os valores de eritrócitos.

Os resultados obtidos para todos os equipamentos mostram o intercepto próximo de zero e a declividade próxima a 0,92, o que reflete os valores do equipamento Cell Dyn 3500 (Abbott) levemente superiores aos demais (variabilidade sistemática). O desvio-padrão da regressão linear ($S_{y/x}$) foi próximo a 0,12, o que significa que a dispersão média dos valores de ERT dos demais equipamentos é 0,12 para um dado valor obtido pelo Cell Dyn 3500 (dispersão randômica). O coeficiente de correlação (r) foi próximo a 0,997 o que indica uma excelente correlação positiva entre os valores do Cell Dyn 3500 e os demais equipamentos. A aceitabilidade da comparação é para valores superiores a 0,9 (Ferreira *et al.*, 2002).

A Tab. II mostra a classificação dos equipamentos pelo número de ocorrências de médias de valores hematimétricos de amostras controle altas, baixas e médias fora dos limites controle para cada equipamento analisado. Entretanto, o uso de diferentes equipamentos leva a erros sistemáticos, que apesar de afetarem os valores de referência, podem ser discriminados com análise estatística. Assim, o aparelho Cell Dyn 3500 foi o que apresentou maior número de ocorrências, com uma tendência a valores levemente mais elevados em relação aos outros equipamentos. O emprego de homogeneização automatizada por movimentos circulares simples dos frascos de sangue para este aparelho, e não por movimentos de inversão ou rotação, como é usual em hematologia, poderia representar um fator de erro.

Este trabalho envolveu a maioria dos equipamentos empregados atualmente em hematologia, e incluiu uma fração representativa da população de Curitiba e Região Metropolitana, já que contou com a colaboração de 14 Laboratórios de médio e grande porte, públicos e privados. Os resultados obtidos indicam que a população curitibana está sendo atendida com qualidade no que se refere à determinação dos valores hematimétricos. Para que a qualidade seja mantida e melhorada, é importante que se incentive a manutenção e a criação de programas de controle de qualidade em laboratório.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho observou-se uma variabilidade dos dados compatível com a existência de erros sistemáticos aceitáveis dentro dos padrões de qualidade, evidenciados de acordo com o laboratório, a participação ou não em programas de controle de qualidade externo ou interno e a natureza

do equipamento utilizado. A comparação entre os resultados obtidos pelos diversos equipamentos mostrou uma boa correlação. Assim, os resultados obtidos permitem apontar para a importância de programas de controle de qualidade continuados em laboratórios.

AGRADECIMENTOS

Aos doadores das unidades de sangue e às equipes do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e dos Laboratórios de Análises Clínicas participantes: Frischmann-Aisengart, Hospital Cajuru, Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital Geral do Exército de Curitiba, Hospital do Trabalhador, Hormocentro, Metrolab, Champagnat, Hospital das Nações, Hospital Nossa Senhora das Graças, Paraná Clínicas, Prefeitura Municipal de Curitiba e Prefeitura Municipal de Araucária, pela cooperação para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Aronsson, T.; Bjornstad, P.; Johansson, S.G.; Leskinen, E.; Raabo, E.; Verdier, C.H. Inter laboratory quality control with investigation of different methodological characteristics. *Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation*, Suécia, v.38, p.53-62, 1978.
2. Bick, R.L. *Hematology: Clinical and Laboratory Practice*. St. Louis: Mosby, 1993.
3. Braga, A.L.; Tutake, E.M.; Nascimento, A.J. Pellissari, C.B.; Stingham, S.T.; Malvezzi, M.; Duarte, L.C.; Leonart, M.S.S. Controle de qualidade externo do eritrograma: uma experiência em laboratórios de análises clínicas do Paraná. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.22, n.4, p. 93-96, 1990.
4. Brasil. Portaria nº 2.135, de 22 de dezembro de 1994. Normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 20 fev. 2003.
5. Cho, H.I. Twenty-years of experiences in external quality assurance in Korea. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, Korea, v.30, n.3, p.32-38, 1999.
6. Dacie, J.V.; Lewis, S.M. *Practical Haematology*. 8 ed. London: Churchill Livingstone, 1995.
7. Emendörfer, F.; Claro, L.M.; Comar, S.R.; Nascimento, A.J.; Leonart, M.S.S. Meio CE e glutaraldeído na preservação de plaquetas para o controle de qualidade em hematimetria. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.191-194, 2000.
8. Ferreira, M.F.R.; Vieira, L.M.F.; Bastos, M. Garantia da qualidade do hemograma automatizado. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.34, n.3, p.121-129, 2002.
9. Fink, N.E.; Alberti, A.F.; Mazziotta, D. External assessment of analytic in hematology: a necessity in Latin America. *Revista Panamericana Salud Publica*, v.2, n.3, p.181-188, 1997.
10. Grimes, A.T. *Human red cell metabolism*. Oxford: Blackwell, 1980. 384 p
11. Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J.W. *Química Clínica: Bases e Técnicas*. 2ª ed. Barcelona: Jims, 1980.
12. Hsu, W.S.; Kao, J. T.; Ho, S.W. Quality assurance in clinical laboratories in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*, Taiwan, v.99, n.3, p.235-242, 2000.
13. Lee, G.R.; Foerster, J.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
14. Leonart, M.S.S. Estudos sobre a preservação de eritrócitos. 131f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994. Orientador: Domênico H. G. P. Barbieri.
15. Leonart, M.S.S.; Granato, E.S.; Nascimento, A.J. Hashimoto, Y.; Leonart, R. Solução preservadora de eritrócitos para controle de qualidade do eritrograma. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.18, p.7-12, 1986.
16. Leonart, M.S.S.; Silva, E.L.; Stingham, S.T.; Nascimento, A.J. Amostra para controle de qualidade do eritrograma estável durante 100 dias. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.21, p.111-113, 1989.
17. Libeer, J.C. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v.309, n.2, p.173-177, 2001.
18. Mckenzie, S.B. *Textbook of Hematology*. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
19. Opartkiattikul, N.; Bejrachandra, S. The external quality assessment schemes in Thailand. *Rinsho Byori*, Tokyo, v.50, n.2, p.121-125, 2002.
20. Osawa, S. The control survey of Japanese association of medical technologists and its possibility of the standardization for the survey. *Rinsho Byori*, Tokyo, v.49, n.9, p.864-867, 2001.
21. Sah, S.P.; Raj, G.A.; Prakash, M.B. Quality assurance program in haematology at a teaching hospital in the eastern region of Nepal. *Indian Journal Pathology Microbiology*, India, v.42, n.2, p.145-149, 1999.
22. Shainin, D.; Shainin, P.D. *Controle Estatístico de Processo*. In: Juran, J.M.; Gryna, F.M. *Controle da Qualidade: Métodos Estatísticos Clássicos Aplicados à Qualidade*. 4 ed. São Paulo: Editora McGraw-Hill, 1993. p.188-250.
23. Stiene-Martin, E.A.; Lotspech-Steininger, C.A.; Koepcke, J.A. *Clinical Hematology: principles, procedures, correlations*. 2ª ed. Philadelphia: Lippincott, 1998.
24. Tatsumi, N. Standardization in hematology. *Rinsho Byori*, Tokyo, v(sup)115, p.1-5, 2001.
25. Timan, I.S.; Aulia, D.; Santoso, W. External quality assessment scheme and laboratory accreditation in Indonesia. *Rinsho Byori*, Tokyo, v.50, n.2, p.126-130, 2002.
26. Thue, G.; Klovning, A.; Sandberg, S. External quality assessment of general practice laboratories: organizational issues and interpretation of feedback reports. *Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation*, Suécia, v.61, n.2, p.103-110, 2001.
27. Vieira, S. *Introdução à Bioestatística*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

Uso do método de cultura semi-quantitativa para estudo de bacteriemia relacionada ao cateter venoso central utilizado por pacientes em hemodiálise

Use of semiquantitative culture method to study bacteremia with central venous catheter related in hemodialysis patients

Elisabeth Eyko Aoki¹, Lourdes Botelho Garcia², Antonio Carlos Pizzolitto³ & Elisabeth Loshchagin Pizzolitto³

RESUMO – As infecções são as principais complicações resultantes do uso de cateter venoso central. Nesta pesquisa 25 pontas de cateter venoso central retiradas de veia subclávia de 16 pacientes ambulatoriais em tratamento de hemodiálise foram analisadas por cultura semi-quantitativa. Hemoculturas foram realizadas pelo sistema Bactec 9050[®]. Os resultados obtidos por cultura semi-quantitativa mostraram que 10(40%) das pontas foram colonizadas (≥ 15 UFC) pelos seguintes microrganismos 3 (30%) *Staphylococcus aureus*, 2 (20%) *Staphylococcus warneri*, 1 (10%) *Staphylococcus epidermidis*, 1 (10%) *Stenotrophomonas maltophilia* e 3 (30%) bacilos difteroides. Das culturas de sangue foram isolados microrganismos identificados como *Staphylococcus aureus*. A bacteriemia foi observada em 12% dos pacientes, e 40% das pontas dos cateteres estudados estavam colonizados

PALAVRAS-CHAVE – Cateter, hemodiálise, método semi-quantitativo, bacteriemia.

SUMMARY – Infections are the leading complication resulting from the use of central venous catheters. In this research a total of 25 catheter tips (subclavian vein) from 16 hemodialysis ambulatory patients were studied by semiquantitative culture method. Blood cultures were made using the Bactec 9050[®]. The results obtained by the semiquantitative culture showed that 10 (40%) of the catheter tips were colonized (≥ 15 CFU) by microorganisms: 3 (30%) *Staphylococcus aureus*, 2 (20%) *Staphylococcus warneri*, 1 (10%) *Staphylococcus epidermidis*, 1 (10%) *Stenotrophomonas maltophilia* and 3 (30%) diphtheroid rods. *Staphylococcus aureus* were identified from blood cultures. The bacteremia was observed in 12% of the patients, and 40% of the studied catheters tips were colonized.

KEYWORDS – Catheter, hemodialysis, semiquantitative method, bacteremia.

INTRODUÇÃO

Para o tratamento de hemodiálise é de fundamental importância o acesso vascular³⁷, o qual pode ser temporário ou permanente⁸. O acesso vascular é dito temporário, quando o cateter venoso central inserido nas veias femoral, ou subclávia ou jugular interna permanece no local por algumas horas até três semanas. O acesso vascular venoso permanente (fístula arterio-venosa ou enxerto arterio-venoso) pode ser utilizado durante meses ou anos e, um procedimento cirúrgico é necessário para a sua inserção^{8,26}. Os cateteres venosos centrais (poliuretano ou polivinil) utilizados em hemodiálise podem ser de duplo ou triplo lúmen não-tunelizados ("Shiley" ou similares)³⁰. Entre os fatores que influenciam o risco de infecção relacionada ao cateter venoso central são citados o número de lúmens e o local no qual o cateter é inserido²⁶, o qual pode estar propenso à infecção, devido ao aumento do trauma ou porque as múltiplas portas podem aumentar a frequência de manipulação do cateter venoso central¹⁴. Os de múltiplo lúmen estão mais associados ao risco de infecção do que os de único lúmen^{14,28}. Outro fator de risco inclui as cateterizações repetidas, presença

de um foco infeccioso em outra parte do corpo, exposição do cateter à bacteriemia, ausência de terapia antimicrobiana sistêmica⁵, duração da cateterização³⁴, experiência do pessoal que insere o cateter, colonização da pele no local da inserção e colonização da conexão/hub^{1,22,33}. Os doentes em hemodiálise, também, são considerados pacientes de risco para adquirir uma infecção sangüínea relacionada ao uso de cateteres^{13,15,22,25}.

As infecções bacterianas são as principais complicações devido ao uso de cateter venoso central em hemodiálise e, apresentam-se como causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes^{6,9,12,18,27,31,36}.

A dificuldade em diagnosticar a verdadeira infecção devido ao uso de cateter intravascular é um problema muito freqüente. Toda vez que existe uma suspeita clínica de infecção, ou seja presença de exsudato purulento no local de saída do acesso vascular próximo da pele e temperatura acima de 38°C, recomenda-se a coleta de sangue do paciente e a remoção do dispositivo intravascular. Um segmento do dispositivo deve ser encaminhado ao laboratório para cultura por método semi-quantitativo e concomitantemente, o sangue

Recebido em 10/3/2004

Aprovado em 29/7/2004

¹Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil

do paciente, para hemocultura^{9,10,19}. Este estudo teve por objetivo detectar por meio de cultura semi-quantitativa de ponta de cateter e de sangue periférico, a bacteriemia relacionada ao uso de cateter venoso central por pacientes em hemodiálise.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Pacientes

No período de janeiro à outubro de 2002, 16 pacientes ambulatoriais que estavam em tratamento de hemodiálise, concordaram em participar deste estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Maringá.

Cateteres

No presente estudo foram avaliadas 25 pontas de cateteres de poliuretano de duplo e ou de triplo lúmen (Arrow International-USA). O cateter foi retirado do paciente pela equipe médica e, em seguida, um segmento de 5cm da ponta foi cortado e colocado em um frasco esterilizado e encaminhado, em caixa de isopor com gelo, ao laboratório de microbiologia clínica, para processamento, não ultrapassando o período de 4 horas.

Sangue

Foram obtidas amostras de sangue periférico de 25 pacientes. As culturas foram realizadas pelo sistema Bactec[®] 9050.

Método

Cultura semi-quantitativa de ponta de cateter¹⁹

O segmento de 5cm foi transferido assepticamente para a superfície da placa de ágar sangue de carneiro (5%) e com auxílio de uma pinça esterilizada foi rolado quatro vezes para frente e para trás, sobre a superfície do meio de cultura.

Após esse procedimento a placa foi incubada a 37°C em estufa bacteriológica por até 72 horas.

A primeira leitura foi realizada após 24 horas de incubação com o objetivo de observar o desenvolvimento microbiano e fazer a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Após a contagem, as colônias foram repicadas e os microrganismos isolados foram identificados por meio de provas bioquímico-fisiológicas²³ e sistema semi automatizado BBL Crystal[™] (Becton Dickinson Microbiology Systems-Maryland, USA) sistema de identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores e fermentadores.

Definição de termos: A colonização da ponta de cateter foi definida como o crescimento microbiano semi-quantitativo de 15 ou mais colônias em placa de ágar sangue¹⁹.

Considera-se bacteriemia relacionada ao cateter quando o mesmo microrganismo for isolado da ponta de cateter em cultura semi-quantitativa e de cultura de sangue de um paciente com acompanhamento clínico dos sinais de infecção e com nenhuma outra fonte de infecção além do cateter²⁴.

Cultura de sangue

Alíquotas de 5 a 8mL de sangue foram coletadas assepticamente da veia periférica de cada paciente e injetada diretamente nos frascos Bactec Plus Aerobic/F* (Becton Dickinson-BD). Em seguida os frascos foram colocados no aparelho Bactec[®]9050 e mantidos sob agitação constante por até 5 dias. Toda suspeita de positividade da amostra foi confirmada em lâmina, por meio de coloração de Gram e, em sub-cultura, em placa de ágar chocolate incubada em microaerofilia a 37°C por 24/48 horas.

Os microrganismos isolados foram identificados por meio de provas bioquímico-fisiológicas²³ e sistema semi automatizado BBL Crystal[™] (Becton Dickinson Microbiology Systems-Maryland, USA) sistema de identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores e fermentadores.

RESULTADOS

Das culturas de ponta de cateter

Dos 25 cateteres examinados pela cultura semi-quantitativa, 10(40%) apresentaram resultados positivos, isto é, crescimento microbiano com número de colônias ≥ 15 unidades formadoras de colônias e 15(60,0%) cateteres não apresentaram desenvolvimento microbiano e foram considerados negativos. A Tab. I mostra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas por meio de cultura semi-quantitativa.

Das culturas de sangue

Das 25 hemoculturas realizadas 3(12,0%) apresentaram desenvolvimento bacteriano (positivas) e em 22(88,0%) não houve o desenvolvimento de microrganismos (negativas). Das três culturas positivas foram isolados cocos Gram-positivos identificados como *Staphylococcus aureus*. O isolamento de microrganismos do sangue e a associação com cultura positiva de ponta de cateter estão apresentados na Tab. II.

TABELA I
Microrganismos isolados em cultura semi-quantitativa de ponta de cateter

Microrganismos	UFC	Número	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	≥ 15	3	30
Bacilos difteroides	≥ 15	3	30
<i>Staphylococcus warneri</i>	≥ 15	2	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	≥ 15	1	10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	≥ 15	1	10
Total		10	100

TABELA II
Microrganismos isolados de ponta de cateter e hemocultura

Pacientes	Cateter	Hemocultura	Ponta de cateter	
			CSQ	(UFC)
A	1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	(≥ 15)
E	5	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	(≥ 15)
G	7	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	(≥ 15)

Legenda: CSQ=Cultura semi-quantitativa; UFC=unidade formadora de colônia.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da infecção relacionada ao cateterismo permanece controversa²⁷. A cultura semi-quantitativa proposta em 1977 por Maki e colaboradores, é considerada a técnica padrão para o diagnóstico das infecções relacionadas ao cateter, por ser a mais simples, de fácil execução e de menor custo ao laboratório de microbiologia, a qual correlaciona o nível quantitativo de 15 ou mais unidades formadoras de colônias sobre a ponta de cateter após cultura semi-quantitativa, com colonização do dispositivo intravascular³².

De acordo com as novas definições do CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*) o cateter é considerado colonizado, quando houver desenvolvimento de 15 ou mais unidades formadoras de colônia por cultura semi-quantitativa, não acompanhado de sinais clínicos. A infecção do sangue é relacionada ao cateter, quando o mesmo microrganismo for isolado do segmento do cateter e do sangue colhido de veia periférica, de um paciente com sintomas clínicos de infecção na corrente circulatória e nenhuma outra fonte aparente de infecção³⁹.

De acordo com Storti (2002)³⁸ em um estudo de colonização microbiana em ponta de cateter venoso central, por cultura semi-quantitativa, observou que a colonização ocorreu em 47,6% das pontas de cateter.

Na presente pesquisa foram utilizadas as técnicas de cultura semi-quantitativa¹⁹ para avaliar a superfície externa. A colonização do cateter foi definida como 15 ou mais unidades formadoras de colônia por cateter obtidas por cultura semi-quantitativa. A cultura semi-quantitativa, de 25 pontas de cateteres intravasculares utilizados por pacientes em hemodiálise mostrou que 10(40%) apresentaram crescimento bacteriano (= 15UFC). Os resultados são semelhantes aos obtidos por Cheesbrough *et al.* (1986)⁷ o qual relata que 43,8% dos cateteres avaliados por cultura semi-quantitativa estavam colonizados. Aufwerber *et al.* (1991)⁴ constataram em cultura semi-quantitativa de pontas de cateteres que em 32,0% houve desenvolvimento microbiano de uma ou mais colônias. Arruda *et al.* (1997)³ observaram colonização microbiana em 29,8% dos cateteres analisados por cultura semi-quantitativa. Menezes *et al.* (2002)²¹ usando a cultura semi-quantitativa, observaram que 57,0% das pontas de cateteres estavam colonizadas. Entretanto, Raad *et al.* (1992)³² ao cultivar 177 cateteres utilizando a técnica semi-quantitativa observaram crescimento microbiano (³15UFC) em 18,6%.

Analisando o isolamento microbiano da ponta de cateter por cultura semi-quantitativa foram encontradas diferentes cepas de microrganismos (Tab. I). As cepas de *Staphylococcus aureus* e de estafilococos coagulase-negativa (*Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus epidermidis*), também foram isoladas de culturas de cateteres de hemodiálise, por outros autores^{2,6,7,9,17,18,20,29,35,36,37}. A *Stenotrophomonas maltophilia* (antiga *Pseudomonas*) foi reclassificada para *Xantomonas maltophilia* e atualmente para *Stenotrophomonas maltophilia*, é uma bactéria Gram-negativa oportunista que cresce facilmente em fluidos de diálise e pode liberar pirogênios moleculares, os quais são diferentes das endotoxinas e pode causar septicemia relacionada ao cateter intravenoso¹².

Na presente pesquisa, observou-se um isolamento de 14,3% de *Stenotrophomonas maltophilia* em ponta

de cateter e, este microrganismo não estava relacionado à bacteriemia, sugerindo colonização do cateter mas não infecção. Dados estes não concordantes com Saad (1999)³⁵ o qual relata o isolamento, em cateteres de hemodiálise, de três cepas de *Stenotrophomonas sp.* e relaciona a presença desta bactéria com bacteriemia. Elting e Bodey (1990)¹¹ reportaram 149 episódios de bacteriemia causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* e por espécies de *Pseudomonas* não *aeruginosa*, na qual o cateter venoso central era a mais comum fonte de origem desta infecção.

No presente estudo, a presença em ponta de cateter de 30% de bacilos difteroides isolados por cultura semi-quantitativa e de 14,3% por cultura quantitativa, apresenta uma taxa de isolamento mais alta quando comparada com os estudos de Capdevila *et al.* (1993)⁶ com o isolamento de 7,7% desses bacilos por cultura semi-quantitativa. Saad (1999)³⁵ isolou bacilos difteroides com uma frequência de 4,7% em cateteres de hemodiálise por cultura quantitativa e Souweine *et al.* (1999)³⁶ relataram uma frequência de 3,3%.

Quanto à bacteriemia relacionada ao cateter, observou-se na presente pesquisa a frequência de 3(12%). O agente etiológico das bacteriemias em três pacientes era *Staphylococcus aureus*. Este microrganismo foi isolado simultaneamente da ponta de cateter e do sangue.

Segundo Almirall *et al.* (1989)² dos 9 episódios de bacteriemia em 44,4% foram isolados cepas de *Staphylococcus aureus* e em 33,3% *Staphylococcus epidermidis*. Marr *et al.* (1997)²⁰ dos 62 casos de bacteriemia relacionada à utilização de cateter, os microrganismos mais frequentemente isolados da corrente sanguínea eram *Staphylococcus aureus* (44%) seguidos de estafilococos coagulase-negativa (19%).

Kessler *et al.* (1993)¹⁶ observaram em seu estudo sobre infecções bacterianas crônicas em pacientes de hemodiálise que os cocos Gram-positivos eram os responsáveis por 69,8% dos episódios bacteriêmicos, entre esses 88,8% *Staphylococcus aureus* e 6,8% estafilococos coagulase-negativa. Lentino *et al.* (2000)¹⁸ relataram que os cocos Gram-positivos eram os organismos predominantes na cultura de sangue com 31% dos isolados identificados como *Staphylococcus aureus*.

Stevenson *et al.* (2000)³⁷ observaram que 82% dos microrganismos isolados da corrente sanguínea eram cocos Gram-positivos, ou seja, 43% *Staphylococcus aureus* e 23% estafilococos coagulase-negativa.

Em nosso estudo também se observou que as bactérias mais frequentemente isoladas foram identificadas como *S. aureus* (30,6%), seguidas por cepas de estafilococos coagulase-negativa (21,7%).

Entretanto, os dados obtidos por Pezzarossi *et al.* (1986)²⁹, Kong *et al.*, (1989)¹⁷, Capdevila *et al.* (1993)⁶, Dittmer *et al.* (1999)⁹, Saad (1999)³⁵ e Souweine *et al.* (1999)³⁶ são discordantes dos obtidos na presente pesquisa e de acordo com estes autores o principal patógeno isolado de infecções relacionadas ao uso de cateter venoso central para hemodiálise são os estafilococos coagulase-negativa.

No entanto, Pezzarossi *et al.* (1986)²⁹ observaram que 75% das culturas, de pacientes com bacteriemia relacionado ao cateter, foram positivas para estafilococos coagulase-negativa, e 25% para *Staphylococcus aureus*.

Kong *et al.*, (1989)¹⁷ relataram que dos 17 casos de

infecções devido aos cateteres vasculares de pacientes em hemodiálise, 9(52,9%) foram devido à cocos Gram positivos e, destes 66,6% foram devido à cepas de *Staphylococcus epidermidis* e 33,3% devido à cepas de *Staphylococcus aureus*.

Capdevila *et al.* (1993)⁶ obtiveram uma frequência de isolamento de 38% de *S. epidermidis* e de 15% de *S. aureus* de episódios de sepses em pacientes cateterizados para hemodiálise.

Dittmer *et al.* (1999)⁹ observaram que as bacteriemias relacionadas ao cateter foram causadas principalmente por estafilococos coagulase-negativa (90,9%).

De acordo com os estudos de Saad (1999)³⁵ dos 142 episódios de bacteriemia associada ao cateter, 39,5% foram causadas por estafilococos coagulase-negativa e 22,1% por *S. aureus*.

Segundo Souweine *et al.* (1999)³⁶ dos 4 pacientes com bacteriemia relacionada ao cateter, em 2(50%) foram isolados cepas de estafilococos coagulase-negativa e em 1(25%) cepas de *S. aureus*.

Os dados desta pesquisa mostram que a cultura semi-quantitativa da ponta de cateter venoso central (hemodiálise) podem ser indicadores de bacteriemia relacionada ao cateter.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CRD/NAC/FCFCAr - UNESP, Araraquara, São Paulo, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Adal, K.A.; Farr, B.M. Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12:208-213, 1996.
2. Almirall, J.; Gonzalez, J.; Rello, J.; Campistol, J.M.; Montoliu, J.; Bellacasa, J.P.; Revert, L.; Gatell, J.M. Infection of hemodialysis catheter: incidence and mechanisms. *Am. J. Nephrol.* 9:454-459, 1989.
3. Arruda, E.; Marinho, I.S.; Rodrigues, E.; Basso, M.; Vilela, I.S.; Gobara, S.; Oplustil, C.P.; Mendes, C.M.; Boulos, M.; Levin, A.S. Central venous catheter-related infections in intensive care units. *Braz. J. Infect. Dis.* 1(4): 182-185, 1997.
4. Aufwerber, E.; Ringertz, S.; Ransjo, U. Routine semiquantitative cultures and central venous catheter-related bacteremia. *APMIS.* 99: 627-630, 1991.
5. Brun-Buisson, C.; Abrouk, F.; Legrand, P.; Huet, Y.; Larabi, S.; Rapin, M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch. Intern. Med.* 147: 873-877, 1987.
6. Capdevila, J.A.; Segarra, A.; Planes, A.M.; Ramirez-Arellano, M.; Pahissa, A.; Piera, L.; Martinez-Vázquez, J.M. Successful treatment of haemodialysis catheter-related sepsis without catheter removal. *Nephrol. Dial. Transplant.* 8:231-234, 1993.
7. Cheesbrough, J.S.; Finch, R.G.; Burden, R.P.A. A prospective study of mechanisms of infection associated with hemodialysis catheters. *J. Infect. Dis.* 154(4): 579-589, 1986.
8. Daugirdas, J.I.; Ing, T.S. *Manual de diálise*, Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1990, 39-56.
9. Dittmer, I.D.; Sharp, D.; McNulty, C.A.M.; Williams, A.J.; Banks, R.A. A prospective study of central venous hemodialysis catheter colonization and peripheral bacteremia. *Clin. Nephrol.* 51(1): 34-39, 1999.
10. Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol.* 15:167-193, 2002.
11. Elting, L.S.; Bodey, G.P. Septicemia due to *Xanthomonas* species and non-aeruginosa *Pseudomonas* species: increasing of catheter-related infections. *Medicine*, 60:196-206, 1990.
12. Ganadu, M.; Mura, G.L.; Campus, A.M.; Cherchi, G.L.; Fanelli, V.; Calvisi, L.; Canu, G.; Cherchi, G.B. Relapsing pyrogenic reactions due to *Xanthomonas maltophilia* in a dialysis patient with a long-term central venous catheter. *Nephrol. Dial. Transp.* 11:197-198, 1996.
13. Gascón, A.; Iglesias, E.; Zabala, S.; Bélvis, J.J. Catheter salvage in patient on hemodialysis with a catheter-related bacteremia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Nephrol.* 20:496-497, 2000.
14. Hilton, E.; Haslett, T.M.; Borenstein, M.T.; Tucci, V.; Isenberg, H.D.; Singer, C. Central catheter infection: single versus triple-lumen catheters. Influence of guide wires on infection rates when used for replacement of catheters. *Am. J. Med.* 84, 667-672, 1988.
15. Kaitwatcharachai, C.; Silpapojakul, K.; Jitsurong, S.; Kalnauwakul, S. An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study. *Am. J. Kid. Dis.* 36:199-204, 2000.
16. Kessler, M.; Hoen, B.; Mayeux, D.; Hestin, D.; Fontenaille, C. Bacteremia in patients on chronic hemodialysis. *Nephron.* 64:95-100, 1993.
17. Kong, N.C.T.; Morad, Z.; Suleiman, A.B. Subclavian catheters as temporary vascular access. *Sing. Med. J.* 30:261-262, 1989.
18. Lentino, J.R.; Baddour, L.M.; Wray, M.; Wonh, E.S.; Yu, V.L. *Staphylococcus aureus* and other bacteremias in hemodialysis patients: antibiotic therapy and surgical removal of access site. *Infection*, 28(6):355-360, 2000.
19. Maki, D.G.; Weise, C.E.; Sarafin, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.* 296(23):1305-1309, 1977.
20. Marr, K.A.; Sexton, D.J.; Conlon, P.J.; Corey, G.R.; Schwab, S.; Kirkland, K.B. Catheter-related bacteremia and outcome of attempted catheter salvage in patients undergoing hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 127:275-280, 1997.
21. Menezes, E.A.; Favali, C.B.F.; Cunha, F.A.; Salviano, M.N.C.; Angelo, M.R.F. Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 34:151-154, 2002.
22. Moro, M.L.; Vigano, E.F.; Lepri, C.A. Risk factors for central venous catheter-related infections in surgical and intensive care units. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15:253-264, 1994.
23. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. *Manual of clinical microbiology*. 7th. Washington, DC: ASM Press, 1999. 1482.
24. Nichols, R.L.; Raad, I.I. Management of bacterial complications in critically ill patients: surgical wound and catheter-related infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33:121-130, 1999.
25. Oliver, M.A.; Callery, S.M.; Thorpe, K.S.; Schwab, E.J.; Churchill, D.N. Risk of bacteremia from temporary hemodialysis catheters by site of insertion and duration of use: a prospective study. *Kid. Intern.* 58:2543-2545, 2000.
26. Pearson, M.L. Guideline for prevention of intravascular device-related infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17(7):438-473, 1996.
27. Pelletier, S.J.; Crabtree, T.D.; Gleason, T.G.; Pruett, T.L.; Sawyer, R.G. Bacteremia associated with central venous catheter infection is not an independent predictor of outcomes. *J. Am. Coll. Surg.* 190:671-680, 2000.
28. Pemberton, L.B.; Lyman, B.; Lander, V.; Covinsky, J. Sepsis from triple vs single-lumen catheters during total parenteral nutrition in surgical or critically ill patients. *Arch. Surg.* 121:591-594, 1986.
29. Pezzarossi, H.E.; Léon, S.P.; Calva, J.J.; La Vega, S.A.L.; Ruiz-Palacios, G.M. High incidence of subclavian dialysis catheter-related bacteremias. *Infect. Control.* 7(12):596-599, 1986.
30. Pitta, G.B.B.; Castro, A.A. Burihan, E. *Angiologia e cirurgia vascular – guia ilustrado*. Maceió, Al. Câmara Brasileira do Livro, 2003, disponível em URL // www.lava.med.br/livro.
31. Raad, I.; Costerton, W.; Sabharwal, U.; Sacilowski, M.; Anaisie, E.; Bodey, G.P. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J. Infect. Dis.* 168:400-407, 1993.
32. Raad, I.I.; Sabbagh, M.F.; Rand, K.H.; Sherertz, R.J. Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15:13-20, 1992.
33. Richtmann, R.; Levin, A.S.S. *Infecção hospitalar relacionadas ao uso de cateteres vasculares*, São Paulo: APECIH, 1997. 41p.
34. Richeh, H.; Hubert, B.; Nitemberg, G. Prospective multi-center study of vascular catheter-related complications and risk factors for positive central-catheter cultures in intensive care unit patients. *J. Clin. Microbiol.* 28:2520-2525, 1990.
35. Saad, T.F. Bacteremia associated with tunneled, cuffed hemodialysis catheters. *Am. J. Kid. Dis.* 34(6):1114-1124, 1999.
36. Souweine, B.; Traore, O.; Aublet-Cuvelier, B.; Badrikian, L.; Bret, L.; Sirot, J.; Gazuy, N.; Laveran, H.; Deteix, P. Dialysis and central venous catheter infections in critically ill patients: results of a prospective study. *Crit. Care Med.* 27(11):2394-2398, 1999.
37. Stevenson, K.B.; Adcox, M.; Mallea, M.C.; Narasimhan, N.; Wagnild, J.P. Standardized surveillance of hemodialysis vascular access infections: 18-month experience at an outpatient, multifacility hemodialysis center. *Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.* 21(3):200-203, 2000.
38. Storti, A. Avaliação da microbiota em ponta de cateter intravenoso, por meio de cultura e a formação de biofilme por meio de microscópio eletrônico de varredura. 2002. 113f. Tese (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
39. Stratton, C.W. Catheter-associated infections: a necessary evil. *Antimicrob. Infect. Dis. Newsl.* 17(7):49-56, 1998.

Endereço para correspondência

Profª Drª Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

CRD/NAC da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara - UNESP

Rua Expedicionários do Brasil 1621 - Araraquara - SP - 14801-360

E-mail: pizzolel@cfcar.unesp.br

Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário?*

Dysuria and polaciuria: really a suggestive symptom of urinary tract infection?

Beatriz Schlatter Hasenack¹, Audrey de Souza Marquez¹, Éryka Helena Trapp e Pinheiro¹, Rosiley Lima Guilherme¹,
Fernanda Tito Frasson² & Gisele de Souza Avelar²

RESUMO – Infecção do Trato Urinário (ITU) é considerada uma das infecções mais comuns na população, sendo responsável por significativa morbidade no sexo feminino. Na rotina dos consultórios médicos ambulatoriais, o tratamento das ITU não complicadas em mulheres adultas é iniciado com base na anamnese, já que a maioria das ITU é acompanhada por sintomas como disúria e polaciúria. O presente estudo visou determinar a correlação entre os sintomas clássicos de ITU e o diagnóstico efetivo desta patologia, caracterizado pela urocultura positiva, através de um inquérito epidemiológico realizado com mulheres com idade de 15 a 55 anos. Das 191 mulheres avaliadas, 56 (29%) apresentaram sintomas sugestivos de ITU. Das 16 mulheres que apresentavam disúria, 2 (12,5%) tiveram o diagnóstico de ITU confirmado. A presença de disúria e polaciúria ocorreu em 27 mulheres, sendo que 5 (18,5%) destas apresentavam realmente ITU. Os coeficientes de correlação entre disúria, polaciúria e a soma destes sintomas com o resultado da cultura foram inferiores a 0,5, demonstrando que não ocorreu correlação significativa entre estas variáveis. Este estudo sugere que a anamnese não deve ser utilizada como critério único para diagnóstico das ITU e que este deve ser confirmado sempre que possível com exames laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE – Infecção do Trato Urinário, diagnóstico, sintomas.

SUMMARY – Urinary Tract Infection (UTI) is considered one of the most common infections in population and remains a significant cause of morbidity in female sex. At ambulatory doctor's routine the treatment of uncomplicated UTI in adult women is initiated based on anamnesis, since most UTI appears with symptoms as dysuria and polaciuria. The objective of this study was to determine the correlation between classical symptoms of UTI and the effective diagnosis of this disease, characterized by positive uroculture, through an epidemiological inquest with women between 15 and 55 years old. From 191 women evaluated, 56 (29%) had suggestive symptom of UTI (dysuria and/or polaciuria). Dysuria was present in 16 women, from which 12.5% had confirmed diagnostic for UTI. The presence of dysuria and polaciuria occurred in 27 women, but only 5 (18.5%) really had UTI. The correlation coefficient between dysuria, polaciuria and the sum of both symptoms with the result of culture was lower than 0.5, showing that no correlation was demonstrated within these variables. This study suggests that anamnesis shouldn't be utilized as the unique criterion for UTI diagnosis and it should be confirmed with laboratorial exams whenever it is possible.

KEYWORDS – Urinary Tract Infection, diagnosis, symptoms.

INTRODUÇÃO

Infecção do Trato Urinário (ITU) pode ser definida como sendo a invasão e multiplicação bacteriana nos tecidos do trato urinário, desde a uretra até os rins, incluindo, no sexo masculino, a próstata e epidídimo. É considerada uma das infecções mais comuns na população, podendo ocorrer em qualquer idade e em ambos os sexos, embora seja mais constatada nas mulheres. As causas das ITU são complexas e influenciadas por fatores biológicos e comportamentais do hospedeiro bem como pelas características infectantes dos uropatógenos (Kunin, 1997; Mobley, 2000).

De acordo com o tipo de infecção, as ITU são subdivididas em sintomáticas, assintomáticas, agudas, recorrentes, crônicas, complicadas e descomplicadas. As ITU complicadas são aquelas que ocorrem em indivíduos com anormalidades anatômica ou funcional do trato urinário. Em geral são decorrentes da estase do fluxo de urina nos rins pela presença de litíase nos rins e na bexiga, podendo também estar associadas a outros fatores, tais como cateterização, instrumentação das vias urinárias, imunossupressão, gestação, *Diabe-*

tes mellitus, bexiga neurológica e tratamento ineficiente. As ITU descomplicadas ou não complicadas são aquelas que ocorrem em indivíduos com o trato urinário normal, sendo representadas principalmente pelas cistites. A diferenciação destes dois tipos de ITU é de grande importância para o estabelecer o tratamento da ITU (Kunin, 1997; Faro & Fenner, 1998; Hooton, 2000).

As mulheres são particularmente afetadas pelas ITU. Estima-se que 40% delas apresentarão um episódio desta infecção em algum momento de suas vidas (Kunin, 1997). Esta maior predisposição parece estar relacionada às características anatômicas do trato genito-urinário feminino, como uretra curta e proximidade entre uretra, vagina e ânus. Existem fatores que aumentam ainda mais o risco de ITU na mulher adulta, como, por exemplo, a atividade sexual, o uso de diafragma com espermaticida, a susceptibilidade à colonização perineal por bacilos Gram-negativos, as doenças ou anormalidades anatômicas que dificultam o esvaziamento normal da bexiga, a instrumentalização das vias urinárias e o baixo nível sócio-econômico (Dachi *et al*, 2000; Hooton, 2000).

Os microrganismos causadores de ITU geralmente provêm da microbiota intestinal. Estes colonizam o pe-

Recebido em 22/12/2003

Aprovado em 8/7/2004

*Trabalho desenvolvido na Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR

¹Docentes do Curso de Farmácia e Bioquímica da Univ. Norte do Paraná (UNOPAR); ²Alunos do Curso de Farmácia e Bioquímica da Univ. Norte do Paraná (UNOPAR)

ríneo e de forma ascendente chegam até a uretra, bexiga, ureter e rins. A *Escherichia coli* é responsável por 70-90% das infecções em pacientes ambulatoriais e por mais da metade das infecções nos pacientes internados. Outras bactérias também associadas às ITU são: *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (Kunin, 1997; Berdichevski et al, 1998; Hooton et al, 2000; Santos, 2003).

O diagnóstico das ITU é baseado na cultura bacteriana quantitativa de urina. Por muitos anos, a cultura era considerada positiva quando apresentasse um crescimento igual ou maior que 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC/mL) (Arav-Borger et al, 1994). Este valor foi escolhido por sua alta especificidade no diagnóstico de ITU verdadeiras. No entanto, estudos demonstram que um terço, ou mais, das mulheres com ITU sintomática apresentam contagens inferiores a 10^5 UFC/mL e que contagens de 100 UFC/mL podem ser consideradas significativas na presença de sintomas clínicos ou de piúria concomitante (Stamm, 1982; Platt, 1983; Hooton, 1990; Kunin et al, 1993).

Um outro exame útil para o diagnóstico das ITU é a urinálise, representada pelo exame de Urina I. A urinálise de rotina engloba a avaliação macroscópica da amostra, a análise química realizada através de fita reagente e o exame microscópico, o qual permite verificar a presença de hematúria, piúria, cilindrúria, bacteriúria e cristalúria no sedimento de urina centrifugada. A urinálise é uma parte essencial da medicina clínica e quando realizada adequadamente, fornece dados que são obtidos de maneira fácil, indolor e com baixo custo. Nos quadros de ITU clássicos causados por enterobactérias, o resultado da Urina I demonstra leucocitúria, pesquisa de nitrito e esterase leucocitária positivas e bacteriúria acentuada. É importante ressaltar, entretanto, que a Urina I não deve ser utilizada isoladamente como critério de diagnóstico ou de exclusão de ITU, pois nem sempre esta patologia leva a alterações significativas neste exame. A especificidade e sensibilidade da leucocitúria em predizer ITU, por exemplo, é de 50% e 80-90%, respectivamente (Semi-niuk & Church, 1999; Strasinger, 2000).

Na rotina dos consultórios médicos ambulatoriais, o diagnóstico das ITU não complicadas em mulheres adultas é feito, em geral, pela anamnese, já que a maioria das ITU é acompanhada por sintomas como disúria e polaciúria (Orenstein & Wong, 1999). Vale lembrar os sintomas sugestivos de ITU (disúria, polaciúria, urgência urinária e dor lombar) nem sempre correspondem à infecção suspeitada, podendo estar presentes em outras patologias (Hooton & Stamm, 1997; Bent, 2002).

O presente estudo visou determinar a correlação entre disúria e polaciúria e o diagnóstico efetivo de ITU, caracterizado pela urocultura positiva, através de um inquérito epidemiológico realizado com mulheres de 15 a 55 anos residentes em um bairro carente de Londrina, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de setembro de 2001 até dezembro de 2002, foi realizado um inquérito epidemiológico com mulheres não gestantes na faixa etária de 15 a 55 anos, residentes no bairro Jardim Monte Cristo, bairro carente da zona leste da cidade de Londrina, Paraná.

O estudo foi realizado de forma prospectiva e experimental e os critérios de inclusão das pacientes foram:

- 1) idade entre 15 e 55 anos,
- 2) não gestante e
- 3) interesse próprio em realizar os exames laboratoriais oferecidos (Urina I e urocultura).

Os dados coletados no inquérito incluíam a caracterização do nível sócio-econômico, sintomas clínicos pré-existent, como dor ao urinar, frequência e urgência urinária, febre, dor lombar, corrimento vaginal, doença de base, gestação e uso de medicamentos. Juntamente com o instrumento de coleta de dados, um termo de consentimento foi preenchido e assinado pela participante, autorizando a realização dos exames laboratoriais e a utilização dos resultados dos mesmos para fins de pesquisa.

Todas as mulheres incluídas no estudo tiveram suas urinas submetidas à avaliação laboratorial, através da realização dos exames de Urina I e urocultura. As pacientes foram orientadas para colher a amostra de urina proveniente do jato médio em frasco estéril, após higienização da genitália externa. A retenção urinária mínima exigida foi de 2 horas.

As amostras assim colhidas foram transportadas até o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Norte do Paraná (LAC), devidamente acondicionadas em isopor e refrigeradas com gelo reciclável. O exame de Urina I foi realizado de acordo com o respectivo Manual de Procedimentos Operacionais Padrão (POP). A análise química da urina foi processada com fitas reagentes *Combur*[®]. A leucocitúria foi caracterizada pela presença de 7000 ou mais leucócitos por ml de urina. A cultura quantitativa de urina foi processada conforme POP disponível no laboratório. A técnica utilizada foi a da alça calibrada (0,01mL), sendo as amostras semeadas nos meios de Agar Cistina-lactose eletrólito deficiente (Cled) e Mac Conkey, os quais foram incubados a 35°C por 18 - 24 horas. Foram consideradas positivas as amostras de urinas que apresentaram um crescimento maior ou igual a 10^5 UFC/mL de um microrganismo em cultura pura. Também foram valorizadas aquelas amostras que apresentaram crescimento inferior a 10^5 UFC/ml de um único uropatógeno, quando oriundas de pacientes sintomáticas.

Para a identificação das enterobactérias isoladas foi utilizada uma série bioquímica composta pelos meios de Agar triplice-açúcar-ferro (TSI), Agar lisina-ferro (LIA), Meio de MIO (MIO), Agar citrato de Simmons (Citrato), Agar uréia de Christensen (uréia) e Agar fenilalanina. Para a identificação dos cocos Gram positivos foram utilizadas as provas de catalase e tolerância ao NaCl 6,5%.

O coeficiente de correlação entre os diferentes sintomas e a urocultura positiva foi calculado através do Excel, sendo que correlações superiores a 0,5 foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Das 191 mulheres, 56 (29%) apresentaram sintomas sugestivos de ITU (disúria e/ou polaciúria) (Fig. 1). Das 16 mulheres que reportaram somente disúria, 2 (12,5%) tiveram o diagnóstico de ITU confirmado (Fig. 2). A presença de disúria e polaciúria ocorreu em 27 mulheres, sendo que 5 (18,5%) destas apresentavam realmente ITU (Fig. 3). O sintoma polaciúria ocorreu

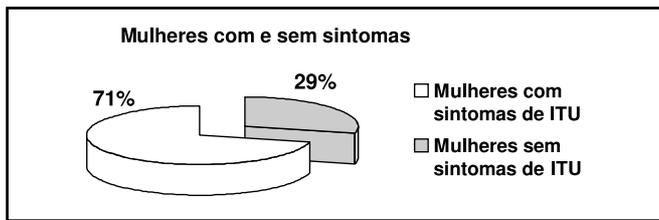


FIG. 1 - Prevalência de sintomas de ITU (disúria e/ou polaciúria) nas mulheres avaliadas (n=191).

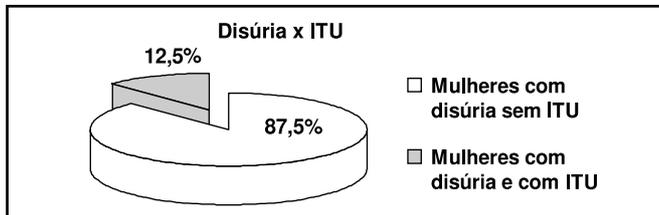


FIG. 2 - Prevalência de ITU nas mulheres que apresentavam disúria (n=16).

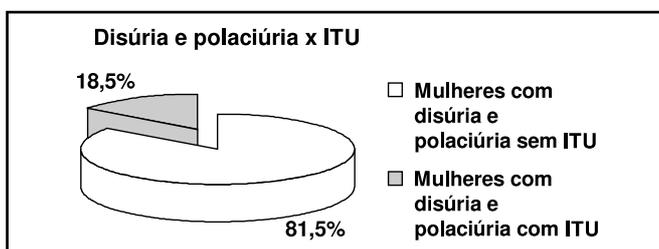


FIG. 3 - Prevalência de ITU nas mulheres que apresentavam disúria e polaciúria (n= 27).

TABELA I

Coefficiente de correlação (r) entre os sintomas de ITU e urocultura positiva

Variáveis	Coefficiente de correlação (r)*
Disúria x urocultura positiva	0,137
Polaciúria x urocultura positiva	0,053
Disúria + polaciúria x urocultura positiva	0,108
Disúria + polaciúria + ausência de corrimento vaginal x urocultura positiva	0,053
Leucocitúria x urocultura positiva	0,263

* $r > 0,5$: correlações significativas, ou seja, variáveis fortemente relacionadas.

isoladamente em 13 mulheres, porém nenhuma delas tinha ITU.

O cálculo do coeficiente de correlação entre sintomas clássicos de ITU (disúria e polaciúria), ausência de corrimento vaginal e urocultura positiva, bem como a avaliação da leucocitúria como indicador de ITU, não demonstrou correlação significativa entre as variáveis avaliadas (Tab. I).

Os microrganismos isolados nas uroculturas positivas foram *Escherichia coli* (57,1%), *Proteus mirabilis* (14,3%), *Streptococcus sp* (14,3%), *Enterococcus sp* (14,3%).

DISCUSSÃO

As infecções do trato urinário agudas não complicadas são frequentes entre as mulheres e responsáveis por mais de 7 milhões de consultas médicas anuais nos Estados Unidos (Foxman, 2003). As mulheres sexualmente ativas possuem um maior risco para o desenvolvimento de ITU, justificado pelas características anatômicas (uretra curta) e certos fatores comportamentais, incluindo demora entre as micções, atividade sexual e uso de diafragmas e espermaticidas (Sobel, 1997; Dachi, 2000).

Os sintomas de ITU aguda incluem queimação ou dor ao urinar (disúria), aumento da frequência entre

as micções, com eliminação de pequena quantidade de urina (polaciúria), sensação de urgência miccional (urgência) e presença de sangue na urina (hematúria). A disúria, acompanhada ou não por outros sintomas de ITU, é causa comum de consulta de mulheres em consultórios ginecológicos e em ambulatório geral. Na rotina clínica, o diagnóstico de ITU não complicadas é feito, em geral, pela anamnese, sendo tratadas para esta infecção àquelas mulheres com queixas de disúria e polaciúria, sem sintomas de vaginite (Cruz & Junior, 2003). Nos Estados Unidos existem organizações mantidas por *staffs* da saúde que diagnosticam e tratam cistites em mulheres de 18 a 55 anos, baseando-se nos sintomas descritos pelas pacientes por telefone. Este procedimento, segundo o estudo realizado, diminuiu os custos e a utilização de laboratórios, mantendo ou melhorando a qualidade das pacientes que foram presumivelmente tratadas para esta infecção (Saint *et al*, 1999). Porém, a avaliação dos sintomas clínicos isoladamente pode levar a erros de diagnóstico. Muitas disúrias agudas, por exemplo, podem não ser decorrentes de ITU, mas ser ocasionadas por vaginites ou uretrites por *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Cândida sp* ou vírus herpes simples (Hooton & Stamm, 1997). Assim, uma análise mais detalhada da história clínica, o exame físico e a solicitação de exames de urina e secreção vaginal ou endocervical são importantes na diferenciação diagnóstica.

Na presente pesquisa foram avaliados sintomas de ITU em mulheres moradoras em um bairro carente da cidade de Londrina. As mulheres respondiam "sim" ou "não" quando questionadas sobre a existência dos seguintes sintomas: 1) urgência e frequência urinária, 2) dor e ardência ao urinar, 3) dor lombar, 4) febre e 5) corrimento vaginal. Como podemos observar na figura 1, 29% delas apresentaram no mínimo um sintoma de ITU.

O grupo das mulheres com sintomas foi então avaliado em relação ao resultado da cultura quantitativa de suas amostras de urina. Foram consideradas positivas as culturas com crescimento de mais de 10^5 UFC/ml, o que é definido por Kass (1955) e Sanford (1956) como sendo bacteriúria significativa. Foram ainda consideradas positivas as culturas de pacientes sintomáticas com contagens inferiores a 10^5 UFC/ml quando um único uropatógeno era isolado. Neste contexto, foram diagnosticados três casos de ITU (contagens de 27.000, 30.000 e 32.000UFC/mL) em mulheres com disúria e polaciúria. Este resultado reforça a importância da comunicação entre o clínico e o laboratório, visto que alguns bacteriologistas tendem a não valorizar contagens baixas, liberando estas uroculturas como negativas.

Das mulheres com disúria, 12,5% apresentavam ITU e daquelas com disúria e polaciúria, 18,5% tiveram o diagnóstico de ITU confirmado. Este dado é muito preocupante, particularmente no Brasil, onde a auto-medicação e as consultas no balcão das farmácias são práticas corriqueiras da população. De acordo com Bent *et al* (2002), a probabilidade de ITU altera substancialmente quando a paciente procura um médico, aumentando de 5% (pacientes sem sintomas de ITU) para 50% (pacientes com um ou mais sintomas de ITU). Nesta avaliação, a morbidade detectada foi a referida, ou seja, as mulheres foram abordadas aleatoriamente e questionadas quanto à presença de sintomas. Este fato pode ter levado a uma super-estimação de sintomas discretos ou irrelevantes. Isto talvez explique parcialmente a

baixa porcentagem de casos de ITU nas mulheres com sintomas clínicos sugestivos.

Para avaliar a relação entre os sintomas descritos e o diagnóstico das ITU, foram calculados os coeficientes de correlação entre disúria e polaciúria e a soma destes dois sintomas com o resultado da cultura. Nesta análise, foram desconsideradas a dor lombar e febre, por não representarem sintomas específicos de ITU. As correlações superiores a 0,5 são consideradas significativas, ou seja, as variáveis estão fortemente relacionadas entre si. Na nossa pesquisa, como pode ser visto na Tab. I, não ocorreu correlação significativa em nenhuma das análises, sugerindo que os sintomas clínicos característicos de ITU não devem ser usados como critério único para diagnóstico desta infecção. Surpreendentemente, a soma dos sintomas disúria e polaciúria também não se correlacionou de forma significativa com o resultado da cultura, reforçando a necessidade de exames adicionais para o diagnóstico das ITU.

Alguns parâmetros determinados pela Urina I podem ser úteis para o diagnóstico precoce de ITU, como a pesquisa de nitrito positivo e leucocitúria. A prova de nitrito representa um método rápido para detectar ITU, particularmente àquelas causadas por enterobactérias (nitrito positivo). As provas de nitrito negativas, entretanto, não descartam a possibilidade de ITU, já que nem todas as bactérias são capazes de converter nitrato a nitrito e resultados falsamente negativos podem ocorrer na presença de contagens baixas (< de 10^5 UFC/ml). Um resultado de Urina I demonstrando leucocitúria, caracterizada pela presença de mais de 7000 leucócitos por ml de urina, e bacteriúria, associado a uma clínica compatível, normalmente é fortemente sugestivo de ITU e permite ao médico o início imediato do tratamento de seu paciente. Por outro lado, a leucocitúria nunca deve ser avaliada isoladamente, uma vez que pode estar presente em outras condições, como doenças tubulointersticiais, contaminação vaginal, glomerulonefrites e apendicite. Também a bacteriúria deve ser criteriosamente analisada, pois esta nem sempre indica ITU e pode ser decorrente de contaminação vaginal ou armazenamento inadequado da amostra até o momento do processamento laboratorial (Semeniuk & Church, 1999; Strasinger, 2000). No nosso estudo, a pesquisa de nitrito foi positiva em todas as amostras de pacientes com ITU causada por enterobactérias em contagens significativas ($> 10^5$ UFC/ml), porém foi negativa nos três casos de ITU causadas por *E. coli* e *Proteus mirabilis* com contagens inferiores a 10^5 UFC/ml, exemplificando a limitação deste dado para diagnóstico rápido de ITU. Todas as amostras das pacientes com infecção, com exceção de uma, apresentaram leucocitúria. Mas, a leucocitúria estava também presente em amostras de urina de pacientes sem ITU e o cálculo do coeficiente de correlação entre leucocitúria e urocultura positiva no nosso estudo foi inferior a 0,5 (Tab. I), corroborando a necessidade da avaliação de outros dados para o diagnóstico correto das ITU.

De acordo com a literatura, sintomas de vaginite, como corrimento vaginal, falam contra ITU (Bent *et al*, 2002). Assim, seria coerente que a ausência destes sintomas associado a disúria e polaciúria aumentasse a chance de diagnóstico de ITU. No nosso estudo, a análise estatística não demonstrou correlação significativa entre estas variáveis (Tab. I) provavelmente devido à baixa prevalência de ITU na população estudada.

CONCLUSÃO

Numa época em que o apelo por uma medicina baseada em evidências está cada vez maior, visando principalmente à diminuição de erros médicos, poderíamos sugerir que o diagnóstico das ITU não seja fundamentado apenas nos sintomas clínicos descritos pela paciente. A solicitação de urocultura quantitativa para comprovar a hipótese diagnóstica deve ser estimulada, já que representa o padrão-ouro para o diagnóstico desta infecção, permitindo o isolamento do microrganismo infectante, a determinação da sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos, além de representar a única forma de diagnosticar os quadros de bacteriúria assintomática e caracterizar as infecções recorrentes, que exigem uma conduta terapêutica diferenciada.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Antonio Roberto G. Monteiro, Professor de Bioestatística da UNOPAR, pelas valiosas sugestões e pela análise estatística realizada.

REFERÊNCIAS

1. Arav-Boger, R.; Leibovici, L. & Danon, Y.L. Infecções do trato urinário com contagens altas e baixas de colônias em mulheres jovens *JAMA-GO2*:1046-1054, 1994.
2. Bent, S.; Nallamothu, B.K.; Simel, D.L.; Fihn, S.D. & Saint, S. Does this woman have an acute uncomplicated urinary tract infection? *JAMA*, 287(20):2701-10, 2002.
3. Berdichevski, R.H.; Zanardo, J.C.; Soibelman, M. & Antonello, I. Prevalência de uropatógenos e sua resistência aos antimicrobianos em uroculturas realizadas no Hospital São Lucas da PUCRS. *Rev AMRIGS*, 42(3):137-142, 1998.
4. Cruz, J. & Junior, J.E.R. Infecções do trato urinário [online] Disponível na internet via <http://www.sbn.org.br/Diretrizes/itu.htm>. Arquivo capturado em setembro de 2003.
5. Dachi, S.P.; Coutinho, M.S.S.A.; Stamm, A.M.N.F. & Nassar, S.M. Fatores de risco para infecção urinária em mulheres sexualmente ativas: um estudo de caso-controle. *RBM*, 57:14-22, 2000.
6. Faro, S. & Fenner, D. Urinary Tract Infections. *Clin Obstet Gynecol*, 41(3) 744-754, 1998.
7. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*, 49(2):53-70, 2003.
8. Hooton T.M. The epidemiology of urinary tract infection and the concept of significant bacteriuria. *Infection*, 18(suppl 2):S40-S43, 1990.
9. Hooton, T.M. & Stamm, W.E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*, 11:551-581, 1997.
10. Hooton, T.M. Pathogenesis of tract urinary infection: an update. *J Antimicrob Chemother*, 46(1):1-7, 2000.
11. Hooton, T.M.; Scholes, D.; Stapleton, A.E.; Roberts, P.L.; Winter, C.; Gupta, K.; Samadpour, M. & Stamm, W.E. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *N Eng J Med*, 343(14):992-997, 2000.
12. Kass, E.H. Chemotherapeutic and Antibiotic Drugs in the Management of Infections of Urinary Tract. *Am J Med*, 18: 764-781, 1955.
13. Kunin, C. M.; White, L. V. & Tong, H.H. A Reassessment of the Importance of "Low-Count" Bacteriuria in Young Women with Acute Urinary Symptoms. *Annals of Internal Med*, 119(6): 454-460, 1993.
14. Kunin, C. Urinary Tract Infections: Detection, Prevention, and Management. 5th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins, 1997.
15. Mobley, H.L. Virulence of two primary uropathogens. *ASM News*, 66(7):403-410, 2000.
16. Orenstein, R & Wong, E.S. Urinary tract infections in adults. *Am Fam Physician*, 59(5):1225-1234, 1237, 1999.
17. Platt, R. Quantitative definition of bacteriuria. *Am J Med*, 75(1B):44-52, 1983.
18. Saint, S.T.; Scholes, D.; Fihn, S.D.; Farrel, R.G.; Stamm, W.E. The effectiveness of a clinical practice guideline for the management of uncomplicated urinary tract infection in women. *Am J Med*, 106:636-641, 1999.
19. Sanford, J. P. *et al*. Evaluation of the Positive Urine Culture. *Am J Med*, 20: 88-93, 1956.
20. Santos, R.C.V.; Lunardelli, A.; Castaman, T.A.; Nunes, F.B.; Pires, M.G.S.; Oliveira, J. R. & Wachter, P.H. Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário. *RBAC*, 35(1):27-28, 2003.
21. Semeniuk, H. & Church, D. Evaluation of leukocyte esterase and nitrite urine dipstick screening tests for detection of bacteriuria in women with suspected uncomplicated urinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9):3051-3052, 1999.
22. Sobel, J.D. Pathogenesis of urinary tract infection. Role of host defenses. *Infect Dis Clin North Am*, 11(3):531-549, 1997.
23. Stamm, W.E.; Counts, G.W.; Running, K.R.; Fihn, S. *et al*. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *New Engl J Med*, 307(8):463-467, 1982.
24. Strasinger, S.K. Uroanálise & Fluidos Biológicos. 3ª ed. São Paulo: Editorial Premier Ltda, 2000.

Endereço para correspondência

Beatriz Schlatter Hasenack
Rua Juscelino Kubitschek, 54
Bairro Jardim Boa Vista I - 86200-000 - Ibiporã - PR
E-mail: hasenack@onda.com.br

Cultura de células primordiais de medula óssea tipo Dexter: um procedimento laboratorial que mimetiza a hematopoese*

Dexter long-term bone marrow culture: a laboratorial procedure that mimics hemopoiesis

Almeriane Maria Weffort-Santos, Ph.D.¹ & Marco Antonio Bittencourt²

RESUMO – Várias técnicas de cultivo têm sido utilizadas na investigação de fatores que influenciam a biologia das células primordiais hematopoéticas, tornando-se fundamentais na elucidação dos mecanismos que envolvem a hematopoiese. Este trabalho descreve o sistema de cultura idealizado por Dexter e colaboradores, no qual proliferação e diferenciação de células primitivas de medula óssea normal ocorrem quando cultivadas em meio sintético enriquecido com soros de animais, hidrocortisona e antibióticos. Células do sobrenadante removidas durante a manutenção das culturas foram quantificadas e ensaiadas para estimativa de seu conteúdo em progenitores hematopoéticos. Simultaneamente, desenvolveu-se uma camada de células aderentes, que foram também contadas e ensaiadas para estimativa de seu conteúdo em progenitores. A fração celular do sobrenadante decaiu de $1,65 \times 10^7$ para uma média de $1,59 \pm 0,42 \times 10^5$ células mononucleares/frasco de cultura após a quinta semana de cultivo, com um platô estabelecendo-se entre esta e a décima semanas. Colônias de GM-CFC de ambas frações foram detectadas em todas as semanas ensaiadas e mostraram-se em maior número na camada aderente. Os resultados demonstram que hematopoiese pôde ser mantida nas condições experimentais testadas devido ao desenvolvimento de um estroma, o qual demonstrou capacidade de sustentar uma população de células primordiais hematopoéticas em contínuas proliferação e diferenciação por 10 semanas.

PALAVRAS-CHAVE – Hematopoese *in vitro*, célula-tronco, cultura de células de medula óssea, cultura tipo Dexter, camada aderente, estroma medular.

SUMMARY – Several culture methods have allowed investigation of factors influencing haemopoietic stem cell biology, providing a tool for exploring mechanisms involving blood cell production. In this work the culture system described by Dexter and colleagues to obtain proliferation and differentiation of primitive progenitor cells from normal marrow is described, in which marrow cells were cultured within a synthetic medium supplemented with animals sera, hydrocortisone and antibiotics. After feeding, the cells of the supernatant were counted and assessed for their content in haemopoietic progenitors. Simultaneously, a stromal layer developed at the flask bottom, originating a population of adherent cells, which was also counted and assessed for their content in haemopoietic progenitors. The non adherent fraction declined from 1.65×10^7 marrow cells/flask to an average value of $1.59 \pm 0.42 \times 10^5$ cells at week 5, establishing a plateau between weeks 5 and 10. The GM-CFC progenitors of both fractions were present at every week assessed and showed to be in greater number in the adherent layer. Thus, haemopoiesis could be maintained *in vitro* in the tested conditions in which normal marrow cells provided the necessary requirements to sustain the stem cell population after establishing a stromal layer.

KEYWORDS – Hemopoiesis *in vitro*, stem cell, long-term culture, Dexter type culture, adherent layer, marrow stroma, LTBMCM.

INTRODUÇÃO

Eritrócitos, leucócitos e plaquetas constituem os elementos celulares hematopoéticos maduros com funções específicas circulantes nos vasos sanguíneos²³. Todos têm sua origem nas células primordiais hematopoéticas, uma população restrita em número que se abriga nos espaços da medula óssea dos mamíferos adultos³⁰ e que, por proliferação e diferenciação progressiva, geram progenitores cada vez mais restritos às linhagens mielóide e linfóide. Esses, por sua vez, amplificam seu número e acabam por originar os vários tipos celulares morfologicamente reconhecidos numa medula óssea normal e no sangue circulante.

Como as células sanguíneas maduras possuem tempo de vida limitado e para que as atividades metabólicas do indivíduo se mantenham constantes (homeosta-

sia), elas precisam ser continuamente substituídas. Além disso, a medula óssea abriga uma reserva dessas células para responder prontamente a situações emergenciais, como por exemplo, uma hemorragia aguda ou uma infecção, sem que haja comprometimento maior da saúde do indivíduo.²³ Para atender às demandas normais de produção e as impostas por regimes de estresse, o sistema hematopoético possui uma organização complexa, a qual depende da interação harmônica e orquestrada entre as células primordiais hematopoéticas e seus descendentes, esses e as células que compõem o microambiente medular (estroma), além das inúmeras moléculas por elas produzidas, particularmente as citocinas.³⁰

Um dos grandes tópicos da pesquisa mundial e que tem ocupado espaço na mídia com relativa frequência é o reconhecimento das células primordiais hematopo-

Recebido em 11/2/2004
Aprovado em 14/7/2004

*Seção de Cultura de Células do Serviço de Análises Clínicas, Hospital de Clínicas, UFFPr - Curitiba, Paraná

¹Profª Adj., Deptº de Patologia Médica, Curso de Farmácia, UFFPr; ²Unid. de Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas, UFFPr

éticas humanas como uma ferramenta na substituição de tecidos adultos devido à sua multipotencialidade, traduzida na sua plasticidade em gerar, *in vitro*, tecidos diferentes do hematopoético²⁸ como o endotélio vascular,³⁸ músculo,^{20,22} células hepáticas^{32,33} ou células nervosas,⁵ dentre outros, dependendo das condições de cultura.

A realização de estudos tão complexos como esses envolve uma coleção de modelos experimentais onde vários fatores que regulam o desenvolvimento de células primitivas multipotentes possam ser cuidadosamente examinados. Neste contexto, o sistema de cultura de células de medula óssea descrito por Dexter e colaboradores para camundongos há quase quatro décadas^{10,11,16} e, posteriormente, adaptado para células humanas,^{17,34} continua sendo o ensaio *in vitro* de escolha. Neste sistema, também conhecido como cultura de células de medula óssea de longa durabilidade (LTBMC), células de medula óssea são inoculadas em meio de cultura apropriado, suplementado com soros animais como fonte de nutrientes por várias semanas e a plena atividade hematopoética pode ser apreciada após o desenvolvimento de uma camada celular estromal na base do frasco de cultura. Na fase seguinte ao estabelecimento do estroma, este passa a secretar para o meio de cultura (sobrenadante), diferentes tipos de progenitores hematopoéticos, os quais podem ser detectados em ensaios clonogênicos. Além disso, células hematopoéticas mais maduras, com características morfológicas e funcionais que se assemelham às encontradas, *in vivo*, na medula óssea de adultos passam a compor o elenco celular tanto do sobrenadante como da camada estromal.²

O objetivo deste trabalho é descrever o sistema de cultura de células de medula óssea humana tipo Dexter, onde material aspirado de medula óssea de doadores voluntários para transplante alogênico foi testado quanto ao seu potencial de desenvolver *in vitro* hematopoese.

METODOLOGIA

A. Pacientes

Todo o trabalho experimental foi desenvolvido em capelas de fluxo laminar classe II. Os dados clínicos e laboratoriais dos 18 indivíduos cujas medulas ósseas foram utilizadas neste estudo estão apresentados na Tab. I e representam um grupo heterogêneo de doadores de medula óssea, composto de 7 homens e 11 mulheres, com idade entre 7 e 48 anos (mediana de 25 anos).

B. Amostras de medula óssea

Dez a quinze mililitros de aspirado de medula óssea foram asepticamente coletados em seringas contendo heparina e diluídos em igual volume do meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM – Gibco), 300mOsm/Kg. Aspirados que apresentavam-se contaminados com muitos eritrócitos foram previamente diluídos com solução à 1% (p/v) de metilcelulose (Methocel – Dow) (concentração final de 0,1%) e permaneceram em repouso por cerca de 40 minutos, à temperatura ambiente, para sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante, rico em células nucleadas foi, então, centrifugado à 800g por 10 minutos e o sedimento de células ressuspenso em 2-3ml de IMDM.

C. Viabilidade e contagem de células

Células de medula óssea com viabilidade superior a 95%, testada com solução à 0,4% de azul de tripano,²⁵ foram contadas em hemocitômetro e sua concentração ajustada para $1,5-2 \times 10^6$ /ml.

D. Estabelecimento das culturas

As culturas tipo Dexter foram estabelecidas de acordo com a metodologia descrita por Coutinho.⁷ Resumidamente, $1,5-2 \times 10^7$ células nucleadas de medula óssea foram inoculadas em 10ml de IMDM 340mOsm/kg suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, 10% (v/v) soro de cavalo (ambos previamente testados em ensaios clonogênicos^{36,37} e 5×10^{-7} M hidrocortisona (Sigma). Os frascos foram incubados às temperaturas de 33 e 37°C, em atmosfera úmida e circulação contínua de 5% de CO₂.

D. Manutenção das culturas (alimentação)

Após 10 dias do início das culturas e em intervalos semanais regulares, o desenvolvimento da camada estromal aderente foi observado examinando-se os frascos de cultura sob contraste de fase em microscopia de luz invertida. Em seguida, metade do volume do sobrenadante desses frascos foi removido e substituído por igual volume de meio de cultura suplementado recentemente preparado. Com o volume retirado dos frascos avaliou-se: (a) o número de células nucleadas/frasco presentes usando-se um hemocitômetro; (b) o número de progenitores de linhagem mista (GEMM-CFC), eritróides (BFU-E e CFU-E) e granulomonócitos (GM-CFC) por frasco, usando-se ensaios clonogênicos previamente descritos,^{36,37} e (c) a composição citomorfológica por meio de citocentrifugados.

E. Porcentagem de área recoberta pela camada estromal (CE)

A porcentagem de área do frasco recoberta pela camada estromal foi avaliada antes da remoção enzimática da fração estromal. Para tanto, removeu-se todo o sobrenadante dos frascos e, após adição de 5ml de IMDM, várias áreas da superfície de crescimento foram examinadas sob microscopia de luz invertida. De forma subjetiva, estimou-se a porcentagem recoberta pela camada estromal (confluência), expressando-a como fração da área total do frasco.

F. Tratamento enzimático da camada estromal

Com a finalidade de se investigar o conteúdo celular estromal quantitativa e qualitativamente, os frascos de cultura foram tratados com solução enzimática após a terceira, sétima e décima semanas de cultura. Primeiro, removeu-se todo o sobrenadante do frasco e lavou-se a camada aderente com IMDM. Para se obter a suspensão das células aderentes, adicionou-se cerca de 2ml/frasco de solução à 0,05% de tripsina (Bacto Trypsin - Difco Laboratories) e incubou-se à 37°C por 10 minutos. Essa população de células aderentes foi, então, quantificada usando-se um hemocitômetro e testada quanto ao seu conteúdo de progenitores, de forma similar à fração sobrenadante descrita acima.

G. Identificação de células adiposas na camada estromal

Onde pertinente, o sobrenadante dos frascos de cultura foi removido e a camada estromal fixada por 10 minutos com solução de formalina tamponada (pH 7,4).

Após remoção do fixador e lavagem com solução à 3% de isopropanol, a camada estromal foi corada com solução à 0,5% de Oil Red O em propilenoglicol por 20 minutos e a presença de células adiposas observadas com auxílio de um microscópio invertido.²⁶

H. Ensaios para progenitores hematopoéticos

O número dos diferentes progenitores hematopoéticos presentes nas frações aderente (camada estromal) e no sobrenadante foi avaliado seguindo as metodologias descritas para GM-CFC³⁶ e para progenitores eritróides.³⁷

I. Identificação das colônias e exame citomorfológico das células hematopoéticas

Após o período de incubação, as colônias que se desenvolveram nos ensaios clonogênicos puderam ser identificadas pelas suas características morfológicas, de tamanho e coloração. Para melhor identificação do conteúdo celular dessas colônias, citocentrifugados de colônias isoladas foram preparados, corados com May-Grünwald-Giemsa e examinados sob microscopia comum, utilizando-se objetivas de imersão. Semelhante procedimento foi realizado com células do sobrenadante.

J. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm 1 erro padrão da média (EPM) de, pelo menos, quatro experimentos mantidos sob condições similares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão "ouro" para a definição de uma célula primordial hematopoética é sua habilidade de restabelecer hematopoese, repovoando a medula óssea de um animal letalmente irradiado e mantê-la em atividade até o final da vida natural deste animal transplantado.³⁰ São, então, atributos de uma célula primordial hematopoética a auto-renovação, ou seja, a capacidade de manter seu

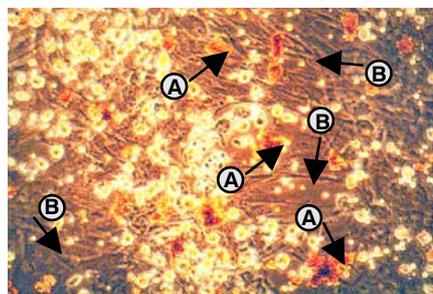


FIG. 1 - Fotomicrografia da camada aderente e do sobrenadante do frasco de cultura tipo Dexter do Experimento 1, iniciado com células de medula óssea, após duas semanas de incubação. (A) Aglomerados celulares flutuantes hemoglobinizados. (B) Células de aspecto fusiformes aderidas à base do frasco (contraste de fase, 64x).

reduzido, mas contínuo, número e a sua capacidade de gerar todas as células de origens linfóide e mielóide, ma-

duas e funcionantes presentes na circulação sanguínea (recentemente revisto em²⁷).

A propriedade maior do sistema de cultura de células de medula óssea tipo Dexter e que o diferencia de todos os outros sistemas até agora descritos é a sua habilidade de manter, *in vitro*, uma população de células primordiais hematopoéticas que, por um lado, se auto-renova, enquanto, por outro lado, prolifera, gerando populações celulares mielóide ou linfóide quando apropriadamente estimuladas.¹⁴ Entretanto, dentro deste sistema, hematopoese só ocorre se houver o desenvolvimento de uma camada de células aderentes à base do frasco de cultura que reproduza os efeitos moleculares reguladores observados *in vivo*.^{12,13}

1. Formação *in vitro* da camada estromal

Com o objetivo de observar-se o estabelecimento de hematopoese *in vitro* usando o sistema de cultura tipo Dexter, monitorou-se, semanalmente, com o auxílio de um microscópio invertido com contraste de fase, o desenvolvimento de uma camada aderente (estromal) à base de frascos de cultura iniciadas com uma suspensão de células nucleadas de medula óssea.

Nas duas primeiras semanas do experimento, observou-se um número muito reduzido de células aderidas à base dos frascos, enquanto numerosos aglomerados celulares puderam ser identificados no sobrenadante. Esses arranjos celulares moviam-se facilmente com um simples e delicado movimento do frasco. Alguns desses grumos eram constituídos de eritrócitos, identificados pela coloração avermelhada característica de células hemoglobinizadas (Fig. 1 - A). Das células aderidas, algumas apresentavam morfologia fusiforme, assemelhando-se a fibroblastos (Fig. 1 - B e Fig. 2 - A), enquanto outras se apresentavam arredondadas e achatadas. Ao final da terceira semana do experimento, os agregados eritrocitários flutuantes haviam praticamente desaparecido, enquanto que o número de células aderentes à base do frasco aumentava. Dentre essas, um pequeno número das células fusiformes passou a acumular vesículas que se assemelhavam à gordura (Fig. 2 - B). Essas células reagiram positivamente à coloração com Red Oil O, revelando seu conteúdo de natureza lipídica (Fig. 3), semelhante a relatos da literatura.^{19,35}

A presença de células adiposas nas culturas tipo Dexter estão associadas a uma maior sobrevivência do sistema, tendo sido citadas como um indicador positivo com relação ao sucesso da cultura na manutenção de células primordiais.⁹ Por outro lado, as diferentes células que estão presentes na camada estromal que se desenvolve progressivamente nesse sistema de cultura assemelham-se, morfológica e funcionalmente, às

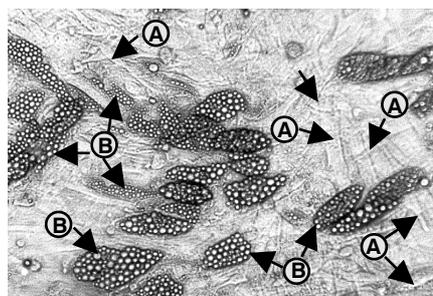


FIG. 2 - Fotomicrografia da camada aderente do Experimento 1 após a 4ª semana de cultura, destacando as células fusiformes semelhantes a fibroblastos (A) e aquelas secretoras de gotas lipídicas (B) (100x).

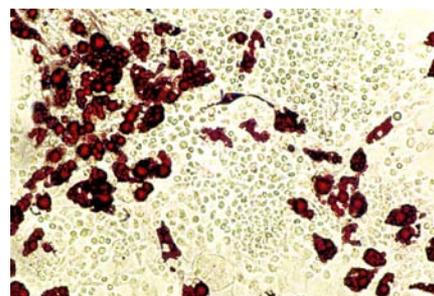


FIG. 3 - Fotomicrografia da camada aderente de Experimento 1 apresentada na Figura 3, destacando as células adiposas com reação positiva (vermelha) para componentes lipídicos após coloração com Oil Red O (100x).

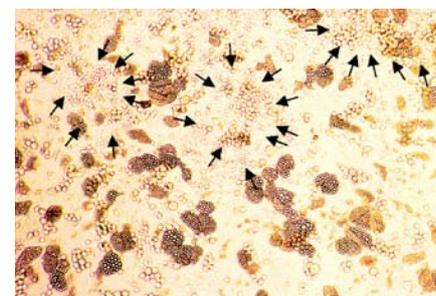


FIG. 4 - Fotomicrografia da camada aderente do Experimento 1 após a quarta semana de cultura, demonstrando vários focos de atividade hematopoética, alguns circunscritos por flexas (32x).

TABELA I

Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos doadores de medula óssea para transplante incluídos neste estudo

Experimento	sexo/idade	Hb (g/dl)	VG (%) ($\times 10^9/l$)	Leucócitos
1	F/18	13,9	39,8	10,9
2	F/27	15,5	45,3	10,0
3	M/44	13,5	40,0	6,3
4	F/30	14,6	41,8	6,3
5	M/9	13,4	39,1	6,1
6	M/21	14,2	42,7	7,7
7	M/29	16,6	48,6	5,2
8	M/12	14,6	36,5	4,6
9	F/33	13,8	41,9	8,2
10	F/23	12,2	38,4	6,7
11	F/14	13,3	40,7	7,5
12	M/36	15,2	43,7	6,3
13	F/7	11,6	36,0	6,0
14	F/17	13,0	38,0	8,8
15	M/34	14,9	43,5	6,6
16	F/39	13,9	41,6	9,0
17	F/48	13,5	39,2	10,8
18	F/19	13,5	38,0	9,4

[Hb] hemoglobina; [VG] hematócrito; [M] masculino; [F] feminino.

TABELA II

Número total de células recuperadas da camada aderente (estroma) das culturas tipo Dexter, após tratamento enzimático com tripsina

Semana de cultura	Número de células aderentes/frasco de cultura
3	$1,79 \pm 0,54 \times 10^6$
7	$1,75 \pm 0,62 \times 10^6$
10	$1,28 \pm 0,57 \times 10^6$

Cada valor representa a média \pm 1 EPM de 5 a 11 experimentos mantidos sob condições similares.

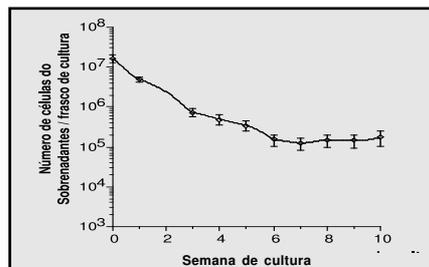


FIG. 5 - Número total de células/frasco recuperadas do sobrenadante após alimentação semanal das culturas de células de medula óssea tipo Dexter. Cada ponto representa a média \pm 1 EPM de 5-8 experimentos mantidos sob condições similares.

encontradas no microambiente medular de mamíferos adultos, particularmente as células endoteliais, os fibroblastos, adipócitos e macrófagos.^{3,4} Além disso, sabe-se que este conjunto celular detém a habilidade de sustentar, *in vitro* e por algumas semanas, a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de células primordiais hematopoéticas.¹

Durante as duas semanas subseqüentes e praticamente até o final do período experimental, o número de células secretoras de lipídios se tornou evidente em várias áreas da camada estromal, enquanto que pequenos aglomerados contendo células arredondadas pequenas, semelhantes a cachos de uvas, tornaram-se mais evidentes na base do frasco de cultura. Diferente das outras populações celulares, esses aglomerados eram fase positivos (Fig. 3) e assemelhavam-se morfológicamente às ilhas de atividade hematopoética descritas por outros autores.^{7,17} Durante este período, observou-se também que mais de 85% da área de base dos frascos de cultura estavam recobertos pela camada estromal. Em contraste, as culturas incubadas à 37°C falharam em alcançar confluência semelhante e foram abandonadas.

O número de células nucleadas presentes na fração aderente, obtido após tripsinização das culturas nas terceira, 7ª e 10ª semanas, permaneceu em números relativamente constantes, como demonstrado na Tab. II.

TABELA III

Diferencial das células recuperadas do sobrenadante das culturas de células de medula óssea tipo Dexter

Semana de cultura	Blastos + Pró-M	Mielo + Meta	Bast + Seg	Eos	Linf	Mono +	Eritr.
Início	$3 \pm 0,8$	27 ± 2	$42 \pm 2,8$	$7 \pm 1,7$	17 ± 3	$4 \pm 0,8$	12%
4	1 ± 1	$5 \pm 0,5$	8 ± 2	$2 \pm 0,4$	$3 \pm 1,7$	81 ± 2	0%

Cada valor representa a média \pm 1 EPM de 4 experimentos, onde um mínimo de 100 células foram contadas para cada ponto. Pró-M: pró-mielócitos; Mielo: mielócitos; Meta: metamielócitos; Bast: neutrófilos bastonetes; Seg: neutrófilos segmentados; Eos: eosinófilos; Linf: linfócitos; Mono: monócitos; Mac: macrófagos; Eritr: eritroblastos.

TABELA IV

Varição do número de progenitores hematopoéticos detectados no sobrenadante e na camada aderente, de acordo com o tempo de cultivo, das culturas de células de medula óssea tipo Dexter

Semana de cultura	Número de progenitores/frasco de cultura						
	Sobrenadante (S)			Relação GM-CFC S/CE	Camada Estromal (CE)		
	GM-CFC	BFU-E	CFU-E		GM-CFC	BFU-E	CFU-E
início	1850 ± 1764	6768 ± 1875	5601 ± 1552	-	-	-	-
3	163 ± 41	8 ± 2	0	2,2:1	73 ± 24	0	0
7	52 ± 21	0	0	1:12,2	632 ± 282	18 ± 8	11 ± 5
10	27 ± 12	0	0	1:1,6	43 ± 19	-	-

Cada valor representa o número de colônias \pm 1 EPM de 5 a 18 experimentos.

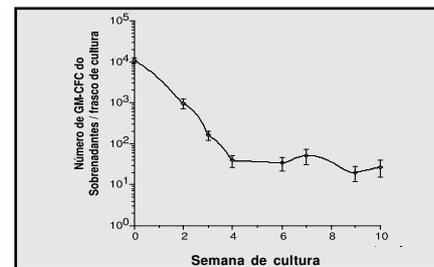


FIG. 6 - Número de GM-CFC/frasco recuperados do sobrenadante após manutenção semanal das culturas de células de medula óssea tipo Dexter. Cada ponto representa a média \pm 1 EPM de 5 a 8 experimentos mantidos sob condições similares.

2. Proliferação e diferenciação de células hematopoéticas em LTBM

Todas as suspensões celulares obtidas, seja as do sobrenadante durante a alimentação semanal das culturas ou obtidas das camadas aderentes após tripsinização, foram quantitativamente avaliadas em hemocitômetro e, posteriormente, ensaiadas para investigação do seu conteúdo em progenitores hematopoéticos.

Em contraste com a população aderente, a qual manteve-se relativamente estável, observou-se um declínio acentuado do número de células recuperadas do sobrenadante durante as 5 primeiras semanas de cultura (Fig. 5). O número total de células nesta fração diminuiu de $1,65 \times 10^7$ (média de células no inóculo inicial) para um valor médio de $1,59 \pm 0,42 \times 10^5$ células/frasco após a 5ª semana. Este valor permaneceu, então, relativamente constante e o número médio de células presentes no sobrenadante na 10ª semana do experimento foi de $1,73 \pm 0,78 \times 10^5$ células/frasco.

Por outro lado, evidente proliferação celular com geração de progenitores de GM-CFC no sistema proposto estava ocorrendo, demonstrado pelos platôs no número de células (Fig. 5) e de colônias (Fig. 6) recuperados do sobrenadante entre as quinta e décima semanas experimentais. O declínio no número desses progenitores durante a fase de estabelecimento das culturas (início até a 4ª semana) está provavelmente

relacionado, primeiramente, à morte natural de células maduras do inóculo inicial e, em segundo, ao período de formação da camada estromal, onde células, provavelmente estromais, presentes no inóculo original, passaram a fazer parte da camada aderente.

A composição celular do sobrenadante dessas culturas observada em citocentrifugados está demonstrada na Tab. III. A mudança mais acentuada observada refere-se ao aumento relativo do número de monócitos e macrófagos a partir da 4ª semana de cultura. Na 8ª semana, mais de 90% das células presentes no sobrenadante eram mononucleares, particularmente macrófagos. Simultaneamente, observou-se um declínio na proporção de granulócitos imaturos (mielócitos e metamielócitos) e maduros (bastonetes e segmentados), assim como de eosinófilos e linfócitos. Eritroblastos deixaram de compor esta fração celular já na segunda semana, enquanto eosinófilos e linfócitos desapareceram desta mesma fração após a 6ª semana. Esses resultados são similares aos previamente publicados.^{7,29}

Células precursoras que possuem a capacidade de proliferar em ensaios clonogênicos, resultando na formação de colônias hematopoéticas típicas, foram detectadas em ambas as frações aderente e sobrenadante durante toda a duração do experimento, porém o número e o tipo de colônias variaram conforme a semana de cultura. Como demonstrado na Tab. IV, progenitores eritróides (BFU-E e CFU-E) foram detectados no estroma até a 7ª semana, mas desapareceram do sobrenadante após a terceira semana experimental. Já a presença de progenitores mielóides como GM-CFC foi contínua e sua produção seguiu um padrão similar ao apresentado pelas células do sobrenadante (Fig. 5), decaindo até a 5ª semana e, depois, mantendo-se em níveis estáveis (Fig. 6) até o final do experimento. Progenitores mais primitivos de linhagem mielóide mista (GEMM-CFC) também foram detectados em nosso sistema, mas somente no sobrenadante e até a 2ª semana de cultura (de 208 ± 58 colônias/frasco no inóculo para 3 ± 1 colônias/frasco na 2ª semana). Nossos resultados quanto à presença de progenitores eritróides e GM-CFC no sobrenadante e na camada estromal assemelham-se aos relatados pela literatura.^{6,8,17,18,21,24,29,31,34} Por outro lado, nossos dados contrastam quanto à presença de GEMM-CFC somente no sobrenadante, onde esses progenitores mais primitivos foram descritos na camada aderente.^{6,15}

CONCLUSÃO

Neste trabalho, usou-se o sistema de cultura idealizado por Dexter para investigar a atividade hematopoética *in vitro* de células de medula óssea obtidas de indivíduos sadios.

Duas fases distintas puderam ser observadas nessas culturas.

A primeira delas, entre o início e as 5 semanas seguintes, mostrou várias mudanças simultâneas, com marcado declínio no número de células e de progenitores presentes no sobrenadante. Como já citado anteriormente, esses resultados provavelmente estão relacionados:

(a) ao processo de alimentação semanal, onde metade do volume do frasco (e, conseqüentemente, metade do número de células) foi substituído por meio de cultura novo;

(b) à aderência das células à base do frasco, com a finalidade de desenvolver o estroma e

(c) à morte natural de células maduras presentes na suspensão inicial.

Na segunda fase, entre a 5ª semana e o fim do experimento, observou-se extensiva proliferação celular *in vitro*, evidenciada pela constância relativa no número de células e progenitores presentes no sobrenadante (platô), apesar da retirada semanal de metade do volume do sobrenadante.

Como o número de células da camada estromal manteve-se relativamente constante (Tab. II), assim como, a produção de progenitores, as mudanças quantitativas semanalmente observadas foram provavelmente decorrentes da liberação para o sobrenadante, não só de células maduras, mas também de progenitores produzidos pelas células primordiais presentes na camada estromal e é mais provável que representem proliferação de fato, do que um simples desprendimento das células estromais.

Nossos resultados corroboram o conceito de que os progenitores eritróides e, particularmente, os GM-CFC que se desenvolveram neste sistema durante a fase estável das culturas (5ª à 10ª semanas) não são representantes numéricos de uma população inicial em declínio, mas sim descendentes de células hematopoéticas primitivas presentes no inóculo que, após se instalarem no estroma formado nas primeiras semanas, adquiriram a competência proliferativa característica das células primordiais hematopoéticas observadas *in vivo*, decorrentes de sua interação com um estroma competente.

Desta forma, o sistema aqui descrito mostrou-se com habilidade de sustentar, por pelo menos 10 semanas, uma população de células primordiais hematopoéticas.

Por outro lado, a ausência de progenitores multipotentes como GEMM-CFC na camada aderente sugere que ajustes às condições aqui descritas devem ser feitos com o objetivo de proporcionar um ambiente estromal mais adequado para que as células primitivas aí alojadas desempenhem seu pleno potencial.

Com isso, esta tecnologia pode contribuir de forma significativa na investigação dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos distúrbios observados nas doenças que acometem o sistema hematopoético ou a ele relacionados, assim como no estudo de moléculas que podem ser testadas como alternativas para o tratamento desses males.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Unidade de Transplantes de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, particularmente ao Dr. R. Pasquini, pelas amostras de medula óssea; aos farmacêuticos L. M. Silveira e N. Farah Pereira, pelas facilidades laboratoriais; à farmacêutica S.M. Fadel, pelo auxílio técnico e, em especial, a Drª N.G. Testa, Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, Inglaterra, pelo material usado como controle dos nossos experimentos.

REFERÊNCIAS

1. Allen, T.D. & T.M. Dexter. 1976. Cellular interrelationships during *in vitro* granulopoiesis. *Differentiation* (6):191-94.

2. Allen, T.D. & T.M. Dexter. 1983. Long term bone marrow cultures: an ultrastructural review. *Scan Electron Microsc* (4):1851-66.
3. Allen, T.D. & T.M. Dexter. 1984. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol* (12):517-21.
4. Allen, T.D., P.J. Simons & T.M. Dexter. 1984. Haemopoietic microenvironments in vitro - which cells are involved? *Blood Cells* (10):467-71.
5. Bjornson, C.R., R.L. Rietze, B.A. Reynolds, M.C. Magli & A.L. Vescovi. 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* (283):534-37.
6. Coulombel, L., A.C. Eaves & C.J. Eaves. 1983. Enzymatic treatment of long term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* (62):291-97.
7. Coutinho, L.H., M.H. Gilleece, EA. Wynter, A. Will & N.G. Testa. 1993. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In: Haemopoiesis - a practical approach. N.G. Testa e G. Molinex (eds). Oxford University Press, Oxford. 75-106.
8. Coutinho, L.H., N.G. Testa & T.M. Dexter 1986. The myelosuppressive effect of recombinant interferon gamma in short-term and long-term marrow cultures. *Br J Haematol* (63):517-24.
9. Dexter, T.M. & T.D. Allen. 1983. The regulation of growth and development of normal and leukaemic cells. *J Pathol* (141):415-33.
10. Dexter, T.M., T.D. Allen & L.G. Lajtha. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* (91):335-44.
11. Dexter, T.M., T.D. Allen & L.G. Lajtha. 1978. Factors controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Symp Soc Dev Biol* (35):149-60.
12. Dexter, T.M., L.H. Coutinho, E. Spooncer, C.M. Heyworth, C.P. Daniel, R. Schiro, J. Chang & T.D. Allen. 1990. Stromal cells in haemopoiesis. *Ciba Found Symp* (148):76-86.
13. Dexter, T.M. & L.J. Fairbairn. 1993. The molecular control of hematopoiesis. *Anticancer Drugs* 4(Suppl 1):5-12.
14. Dexter, T.M., E. Spooncer, P. Simmons & T.D. Allen. 1984. Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. In: Long-term bone marrow culture. D. G. Wright e J. S. Greenberger (eds). Alan R. Liss, Inc., New York. 57-96.
15. Dexter, T.M., E. Spooncer, J. Varga, T.D. Allen & M. Lanott. 1983. Stromal cells and diffusible factors in the regulation of haemopoietic cell development. In: Haemopoietic Stem Cell, Alfred Benzon Symposium Cell. S.-A. Killman, E.P. Cronkite e C.N. Muller-Berat (eds). Munksgaard, Copenhagen. 303-322.
16. Dexter, T.M., E.G. Wright, F. Krizsa, and L.G. Lajtha. 1977. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long-term marrow cultures. *Biomedicine* (27):344-49.
17. Gartner, S. & H. S. Kaplan. 1980. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (77):4756-59.
18. Greenberg, H.M., P.E. Neuberger, L.M. Parker, T. Novak & J.S. Greenberger. 1981. Human granulocytes generated in continuous bone marrow cultures are physiologically normal. *Blood* (58):724-32.
19. Greenberger, J.S. 1979. Cortico-steroid-dependent differentiation of human marrow preadipocytes in vitro. *In vitro* (15):823-28.
20. Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel & R.C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* (401):390-94.
21. Hocking, W.G. & D.W. Golde. 1980. Long-term human bone marrow cultures. *Blood* (56):118-24.
22. Jackson, K.A., T. Mi & M.A. Goodell. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* (96):14482-86.
23. Lee, G.R., J. Foerster, J. Lukens, F. Paraskevas, J.P. Greer & G.M. Rodgers. 1999. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2763p.
24. Marsh, J.C., J. Chang, N.G. Testa, J.M. Hows & T.M. Dexter. 1990. The hemopoietic defect in aplastic anemia assessed by long-term marrow culture. *Blood* (76):1748-57.
25. Merchant, D., R. Kahn & W. Murphy. 1964. Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing, Broken Arrow. 147p.
26. Mikel, U.V. 1994. Advanced laboratory methods in histology and pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington. 198-99.
27. Orkin, S.H. 1996. Development of the haemopoietic system. *Curr Opin Genet Dev* (6):597-602.
28. Orkin, S.H. 2000. Diversification of haemopoietic stem cells to specific lineage. *Nature Rev* (1):57-64.
29. Potter, C.G., A. C. Rowell & D.J. Weatherall. 1981. Continuous long-term culture of human bone marrow. *Clin Lab Haematol* (3):245-55.
30. Quesenberry, P.J. & G.A. Colvin. 2000. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In Williams Hematology. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Collier, T.J. Kipps, and U. Seligshin (eds). McGraw-Hill, New York. 153-174.
31. Slovic, F.T., C.N. Abboud, J.K. Brennan & M.A. Lichtman. 1984. Survival of granulocytic progenitors in the nonadherent and adherent compartments of human long-term marrow cultures. *Exp Hematol* (12):327-38.
32. Theise, N.D., S. Badve, R. Saxena, O. Henegariu, S. Sell, J.M. Crawford & D.S. Krause. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* (31):235-40.
33. Theise, N.D., M. Nimmakayalu, R. Gardner, P.B. Illei, G. Morgan, L. Teperman, O. Henegariu & D.S. Krause. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* (32):11-6.
34. Toogood, I.R., T.M. Dexter, T.D. Allen, T. Suda & L.G. Lajtha. 1980. The development of a liquid culture system for the growth of human bone marrow. *Leuk Res* (4):449-61.
35. Touw, I. & Löwenberg. 1987. No stimulative effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* (61):770-74.
36. Weffort-Santos, A.M.S., M. Chimelli & S.M. Fadel. 1994. Proliferação, diferenciação e caracterização de progenitores hemopoieticos GM-CFC in vitro. *Rev Bras Anal Clin* (26):7-11.
37. Weffort-Santos, A.M.S., M. Chimelli, S.M. Fadel, L.M. Mello & C.R. Andrichetti. 1995. Detecção de progenitores hemopoieticos eritróides (BFU-E e CFU-E) em medula óssea, sangue de cordão umbilical e sangue periférico usando rh-EPO. *Rev Bras Anal Clin* (27):19-24.
38. Wood, H.B., G. May, L. Healy, T. Enver & G.M. Morris Kay 1997. CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood* (90):2300-11.

Endereço para correspondência

Dr^o A.M. Weffort-Santos

Dep. de Patologia Médica, Curso de Farmácia, UFPR

Rua Paula Gomes, 586/201, São Francisco, Curitiba, PR - 80510-070

Fone: (0xx41)360-4087 - E-mail: almeriane@ufpr.br



XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

V Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

22 a 26 de maio de 2005

Centro de Convenções de Goiânia
Goiânia - GO

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Epidemiologia das infecções bacterianas e fúngicas diagnosticada através de hemocultivos, no Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM, RS*

Bacterial and fungi infections epidemiology diagnosed by blood culture in Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM, RS, Brazil

Bettina H. Meneghetti¹, Adenilde Salla², Nara Lúcia Dal Forno¹, Loiva T. Oliveira¹, Roselene Righi¹ & Sydney Hartz Alves²

RESUMO – O presente estudo descreve a etiologia dos episódios infecciosos da corrente sanguínea, diagnosticados através de hemoculturas, observados no âmbito do Hospital Universitário de Santa Maria entre 1999 e 2001. Dos 2027 hemocultivos positivos, 53,9% foram devidos a cocos gram positivos; 17% devido a bacilos gram negativos não-fermentadores; 16,64% devido a bacilos gram negativos fermentadores e 4,88% por leveduras do gênero *Candida*. O estudo da suscetibilidade dos isolados detectou que 37,1% de *Staphylococcus aureus* eram oxacilina resistentes e, entre *Staphylococcus epidermidis*, esta resistência atingiu 65% dos isolados. Os autores comparam seus resultados com estudos semelhantes desenvolvidos em outros centros brasileiros e no exterior

PALAVRAS-CHAVE – Epidemiologia; hemoculturas; candidemias.

SUMMARY – This study describes the etiology of the blood infections observed in Hospital Universitário de Santa Maria from 1999 to 2001. During the 36-month study period, a total of 2.027 were positive blood cultures. Overall 53.9% were due to gram-positive cocci; 17% due to nonfermentative gram-negative bacilli; 16.64% due to fermentative gram-negative bacilli and 4.88% due to *Candida* sp. The antibacterial susceptibility of the isolates detected that 37.1% of *Staphylococcus aureus* were oxacillin-resistant and this resistance was either observed in 65% of *Staphylococcus epidermidis*. The authors compare their results with others Brazilian and strangers studies.

KEYWORDS – Epidemiology; blood culture; candidemia.

INTRODUÇÃO

Os episódios infecciosos na corrente sanguínea, tais como: bacteremias ou fungemias, são geralmente graves e trazem o potencial risco de óbito. Em vários estudos europeus, as taxas de mortalidade atribuídas às bacteremias variam de 10-50%. Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) referentes a uma década, também evidenciam o substancial aumento das bacteremias^{4,5}. As comunidades médico-científicas de todos os continentes mostram-se interessadas nas alterações epidemiológicas ocorridas nos últimos 15 anos^{6,7}, evidenciando-se substituição ou inclusão de novos patógenos.

Recentes estudos focalizando as infecções presentes na corrente sanguínea têm identificado *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* sp. e bacteremias polimicrobianas como importantes fatores de risco de óbito. Outros estudos, nessa mesma linha, ainda sugerem que a ocorrência de pneumonia, enquanto origem da bacteremia nosocomial, também prediz mortalidade. Vários estudos têm examinado o perfil dos patógenos mais implicados em mortalidade^{2,7}, sobressaindo-se que 53,92% das bacteremias são causadas por *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, 25% causadas por bacilos Gram-negativos, 30% causadas por enterococos e, em torno de 30% são causadas por *Candida* sp.

Concomitante às alterações nos aspectos epidemiológicos dos agentes infectantes também se vislumbra um quadro preocupante, onde, a resistência bacteriana parece se configurar num evento sempre presente e desafiador^{8,9}.

As constantes alterações na incidência dos agentes infecciosos no meio hospitalar e a rápida emergência e disseminação de bactérias resistentes aos principais antibacterianos enfatizam a necessidade e importância das ações e/ou programas de monitoramento do perfil de resistência no âmbito hospitalar¹⁰.

Os dados obtidos nas ações ou programas objetivados à vigilância epidemiológica podem prover informações muito valiosas para o entendimento da disseminação da resistência bacteriana e, ainda, se constituir no ponto de partida para a aplicação de medidas visando o controle.

Com o avanço das ciências médicas, procedimentos e tratamentos mais sofisticados, transplantes e a maior sobrevida ao câncer, surgiu o paciente imunocomprometido, frequentemente atingido por episódios de candidíases. As candidemias representam, hoje, um quadro importante no contexto hospitalar, com falhas terapêuticas frequentes e exacerbadas pela possibilidade da emergência de resistência aos antifúngicos poliênicos e azólicos. As taxas de candidemias têm aumentado drasticamente.^{7,8}

Recebido em 5/11/2003

Aprovado em 1/3/2004

*Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

¹Farmacêutico-bioquímico. Lab. de Análises Clínicas, HUSM; ²Prof. Adj. Dept^o de Microbiologia e Parasitologia. Campus da UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

Considerando-se que o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) representa uma importante referência médico-científica na região central do Rio Grande do Sul, o presente estudo relata a epidemiologia das bacteremias e fungemias diagnosticadas no setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas, deste hospital.

MATERIAL E MÉTODOS

Hemocultivos

Os hemocultivos foram realizados em frascos de hemocultura do sistema automatizado Bactec (Bexton Dickinson), utilizando-se técnica padrão para colheita/transporte do material biológico. A detecção ultrasensível da produção de CO₂, baseada na fluorescência, permite detecção bacteriana em até 5 dias e até 14 dias para detecção fúngica. Os frascos de hemocultivo continham uma resina catiônica e absorvente de polímeros que promove aumento de positividade em até 33%.

Identificação bacteriana^{2,10,11}

Utilizou-se o sistema automatizado *AutoScan Dade*, o qual é fundamentado no estudo do metabolismo bacteriano frente a diversos substratos. Foram também incluídas provas adicionais, como catalase, *clumping factor*, coagulase, suscetibilidade a novobiocina, hemólise, suscetibilidade a optoquina, oxidase etc. Para identificação das leveduras do gênero *Candida* empregou-se as técnicas clássicas utilizadas em micologia médica.

Testes de suscetibilidade aos antibacterianos

Foram realizados através de dois métodos: o sistema automatizado *AutoScan Dade* que fornece as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e a técnica de difusão em ágar padronizada por Kirby-Bauer adequada ao documento M100-S11 do NCCLS, 2001.

RESULTADOS

Entre janeiro de 1999 e dezembro de 2001, o setor de Microbiologia do HUSM processou 12.282 hemocultivos, dos quais 10.255 (83,49%) resultaram sem crescimento e 2.027 (16,5%) resultaram em crescimento microbiano (Tab. I).

Os hemocultivos positivos evidenciaram cocos Gram-positivos (53,92%), bacilos Gram-negativos não fermentadores (17,06%), bacilos Gram-negativos fermentadores (16,64%) e ainda, 4,88% resultaram em crescimento de fungos leveduriformes (Tab. II).

TABELA I
Hemocultivos realizados pelo setor de Microbiologia do HUSM entre janeiro de 1999-2001

Ano	Positivas		Negativas		Total/Ano
	M*	%	M*	%	
1999	779	18,99	3.322	81,00	4.101
2000	675	16,15	3.503	83,84	4.178
2001	573	14,31	3.430	85,68	4.003
TOTAL	2.027	16,50	10.255	83,49	12.282

TABELA II
Grupos mais frequentes em hemoculturas positivas no HUSM (1999-2001)

Grupo	M*	%
Cocos Gram-positivos	1.093	53,92
Bacilos Gram-negativos fermentadores	337	16,62
Bacilos Gram-negativos não fermentadores	346	17,06
Fungos leveduriformes	99	4,88

TABELA III
Cocos Gram-positivos isolados em hemocultivos

Gêneros/Espécies	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36,31
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,27
<i>Staphylococcus hominis</i>	10,03
Total gênero <i>Staphylococcus</i>	78,61
Gen. <i>Streptococcus</i>	4,64
Gen. <i>Enterococcus</i>	2,42
Gen. <i>Micrococcus</i>	1,63

TABELA IV
Bacilos Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores mais isolados em hemocultivos

Gêneros/Espécies	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29,08
<i>E. coli</i>	28,18
<i>E. cloacae</i>	8,01
<i>Pseudomonas</i> sp.	18,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,89
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	14,45
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12,13

TABELA V
Percentuais de resistência de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* aos principais antimicrobianos utilizados no HUSM

Antimicrobianos	Espécies	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Oxacilina	37,77	65,00
Cefalotina	34,40	62,60
Ciprofloxacina	27,00	65,50
Imipenen	32,50	43,00
Teicoplanina	0,60	0,38
	<i>E. coli</i>	
Ampicilina	56,60	
Aztreonam	9,34	
Amicacina	4,46	
Imipenen	3,21	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Gentamicina	29,74	
Ceftriaxona	56,20	
Ceftazidima	32,13	
Imipenen	32,23	
Piperacilina	20,00	
Ampicilina + sulbactam	56,50	

No grupo dos cocos Gram-positivos observou-se que os gêneros identificados foram *Staphylococcus* (45,24%), *Streptococcus* (4,64%), *Enterococcus* (2,42%), *Micrococcus* (1,63%). A Tab. III indica as espécies de

Staphylococcus, destacando-se os maiores percentuais para *Staphylococcus epidermidis* (36,31%), *Staphylococcus aureus* (32,27%) e *Staphylococcus hominis* (10,03%); espécies pouco comuns foram também observadas.

Entre os bacilos Gram-negativos fermentadores (Enterobactérias) as espécies mais prevalentes foram *Klebsiella pneumoniae* (29,08%), *E. coli* (28,18%), *Enterobacter cloacae* (8,01%) (Tab. IV).

Em relação aos bacilos Gram-negativos não fermentadores *Pseudomonas* sp. (18,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (15,89%), *Acinetobacter lwoffii* (14,45%) e *Acinetobacter baumannii* (12,13%) foram os mais prevalentes.

Os perfis de sensibilidade/resistência podem ser assim resumidos:

Distribuição topográfica

Com relação à distribuição topográfica, a maior prevalência de hemocultivos ocorreu na Unidade de Tratamento Intensivo de Recém-Nascidos (UTI/RN) com 15,58%, seguida da Unidade de Pediatria (11,24%), Unidade de Clínicas Médicas (11%), Unidade de Hemato-Oncologia (9,66%) e Centro de Tratamento Intensivo Pediátrico (9,57%).

Staphylococcus aureus evidenciaram os seguintes percentuais de resistência aos antibacterianos: oxacilina (37,17%), cefalotina (34,4%), ciprofloxacina (27%), imipenen (32,5%), teicoplanina (0,6%) e nenhum isolado evidenciou resistência a vancomicina.

Staphylococcus epidermidis apresentou percentuais de resistência como segue: oxacilina (65%), cefalotina (62,6%), imipenen (65,5%), ciprofloxacina (43%), teicoplanina (0,38%) e, igualmente sem resistência a vancomicina.

Nos 95 hemocultivos de onde se isolou *E. coli*, o perfil de suscetibilidade evidenciou resistência a ampicilina (56,6%), aztreonam (9,34%), amicacina (4,46%) e imipenen (3,21%).

As espécies do gênero *Enterococcus* estiveram presentes em 49 hemocultivos, todas sensíveis a vancomicina, mas com taxas de resistência como: ampicilina (23,65%), tetraciclina (43,89%) e imipenen (23,2%).

O gênero *Pseudomonas* foi responsável por 34,09% dos hemocultivos positivos evidenciando perfil de resistência a gentamicina (29,74%), ceftriaxona (56,2%), ceftazidima (32,13%), imipenen (32,23%), piperacilina (20%) e 56,5% à associação ampicilina + sulbactam.

O gênero *Acinetobacter* foi isolado em 139 hemocultivos (36,6% dos bacilos Gram-negativos não fermentadores), evidenciando resistência a cefotaxima (31%), imipenen (14,5%), ceftazidima (26,3%), gentamicina (29,75%), piperacilina (23,10%) e 19,53% de resistência à associação ampicilina + sulbactam.

Entre 2.027 hemocultivos positivos 99 (4,88%) foram devidos a espécies de *Candida*.

DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos brasileiros são, via de regra, fragmentários, devido à ausência de uma agência governamental de saúde operante e contínua. Nesse contexto, os resultados apresentados neste estudo têm sua discussão prejudicada, em se tratando do cenário brasileiro de infectologia.

O percentual de hemocultivos positivos no HUSM (16,5%) foi superior ao observado por Albuquerque *et al.*¹ (11,7%), referente ao Hospital 9 de Julho e Maternidade Santa Marina (SP).

Os isolamentos de cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, bem como *Candida* sp, são similares aos observados em estudos multicêntricos realizados nos Estados Unidos⁹ e parcialmente concordantes com os de Edmond *et al.*⁹ e Sader *et al.*¹², pois no HUSM, o gênero *Enterococcus* representou apenas 2,42% e em relação ao *S. aureus*, o HUSM tem maior número de isolamentos.

Em relação aos bacilos Gram-negativos, nossos achados são similares aos relatados por Basile Filho *et al.*³ e, parcialmente, diferentes aos relatados por Albuquerque *et al.*¹

No âmbito da resistência bacteriana destacamos a resistência de *S. aureus* a oxacilina (MRSA) em 37,1%, o que coloca o HUSM no mesmo contexto de outros hospitais brasileiros, cuja prevalência de MRSA oscila entre 30-41%¹². Por outro lado *S. epidermidis* (MRSE) têm sido mais freqüentes (65%) em nosso meio do que outros autores revelam (42 a 56%)¹². Em outro aspecto sublinhamos também a absoluta ausência de *Enterococcus* spp resistentes a vancomicina em nosso meio, enquanto Edmond *et al.*⁹ já revelam percentuais elevados para este fenômeno.

Os percentuais de resistência observados entre *E. coli*, *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* são concordantes com os apresentados por autores^{1,9,12}.

Os percentuais de candidemias observados no HUSM são similares aos registrados por Basile Filho *et al.*³ (5%) e por Sidrim *et al.*¹³, que registraram percentuais de 3% nas candidemias. Entre as espécies, observou-se 63,3% de casos de *C. albicans*, 31,3% de *C. parapsilosis*, 2% de *C. tropicalis* e 2% causados por *C. lusitanae*.

REFERÊNCIAS

1. Albuquerque, M.V.P.; Biral, C.; Depretis, N.M. Estudo das cepas isoladas em hemocultura automatizada em dois hospitais particulares de São Paulo. *News-lab*. v.37, p.33-39, 2000.
2. Antunes, G.S. *Manual de diagnóstico bacteriológico*. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 278 p.
3. Basile Filho, A. *et al.* Sepses primária relacionada ao cateter venoso central. *Medicina*. Ribeirão Preto, v. 31, p. 363-8, 1998.
4. Bone, R.C. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* v. 115, p. 457-69, 1991.
5. Bryce, E.A.; Roberts, F.J.; Sekhon, A.S. *et al.* Yeast in blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 15, p. 233-7, 1992.
6. Capone Neto, A. *et al.* Semi quantitative cultures in diagnosing venous catheter-related sepsis. *Rev. Paul. Med.* v. 110, p. 22-6, 1992.
7. David, C.M.N. Infecção em UTI. *Medicina*. Ribeirão Preto, v. 31, p. 337-48.
8. Dromer, F.; Dupont, B. The increasing problem of fungal infectious in the immune-compromised host. *J. Mycol. Méd.* v. 6, suppl. 1, p. 1-6, 1996.
9. Edmond, M.B. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infection in United States Hospitals: a three-year analysis clinical infections diseases. *Clin. Infect. Dis.* v. 29, p.239-244, 1999.
10. Kamine, A. *et al.* Choque séptico. In: Knobel, E. *Condutas no paciente grave*. São Paulo: Atheneu, p. 175-210, 1994.
11. Mac Faddin, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980, 301 p.
12. Sader, H.S. *et al.* Bacterial Pathogens Isolated from Patients with Bloodstream Infections in Latin America, 1997: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 3, p.97-110, 1999.
13. Sidrim, J.J.C. Micose oportunistas. In: Sidrim, J.J.C.; Moreira, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Endereço para correspondência

Universidade Federal de Santa Maria. Campus da UFSM
Santa Maria, RS, Brasil
Fone/fax: (55)220-8906
E-mail: hartzsa@ccs.ufsm.br

Avaliação da sensibilidade e especificidade da metodologia de enzimaímunoenensaio com micropartículas para a dosagem de ferritinas

Sensibility and specificity evaluation of microparticle enzyme immunoassay method for ferritin measurement

S. Lunedo¹, R. Pontarolo¹ & M.E.M. Rocha²

RESUMO – A ferritina é a principal proteína envolvida no armazenamento de ferro, sendo encontrada no meio intracelular e também como um constituinte normal do plasma, fluídos corporais e das hemácias circulantes. Ferritinas derivadas de diferentes tecidos apresentam distintas propriedades como: estrutura primária, teor de fosfato no núcleo mineral, mobilidade eletroforética e proporção relativa de subunidades H e L, determinando diferenças estruturais, imunológicas, em ponto isoelétrico e capacidade oxidativa. Estudos demonstram a relação direta entre a concentração de ferritina no soro e os estoques de ferro nos tecidos. Os sistemas comerciais disponíveis para a dosagem de ferritina plasmática nos laboratórios clínicos, estão baseados em ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos antiferritina específicos ligados à enzimas. Neste trabalho avaliamos se a metodologia de enzimaímunoenensaio com micropartículas (MEIA), do sistema ASXYM – Abbott Laboratories, quantifica adequadamente ferritinas em função do tecido de origem (baço, fígado e coração), e se alguns medicamentos, especialmente de uso prolongado, podem influenciar na metodologia. Os resultados das dosagens de ferritinas teciduais indicaram especificidade e sensibilidade para ferritina de baço (93 a 100%), porém não quantificando adequadamente as ferritinas de fígado (10%) e coração (0%). No estudo de possível interferência causada por medicamentos (nitrofurantóina, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina), observou-se que em concentrações específicas de fármaco e proteína ocorre interferência significativa da ciprofloxacina na metodologia e, como consequência, nos resultados.

PALAVRAS-CHAVE – Dosagem de ferritina; enzimaímunoenensaio com micropartículas; sensibilidade; especificidade.

SUMMARY – Ferritin is the main protein involved in iron storage, and it is also found in plasma. There are specific tissue ferritins, with different properties as primary structure, phosphate ratio at mineral core, electrophoretic mobility, variable proportion of H and L monomers, which lead to different structural, immunological, isoelectric point and oxidation activity characteristics. Studies exhibited a direct relation between plasmatic ferritin concentration and tissue storage. The ferritin measurement is based upon enzymatic immunoassays using specific antiferritin antibodies linked to enzymes. This present work intended to of the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) in measuring ferritin concentration from different origins as spleen, liver and heart, as well as trying to check if some drugs may affect the results. The ferritin tissue measurement data disclosed using this method indicate high specificity to spleen ferritin (93 to 100%), moderate to liver ferritin (10%) and absence to heart ferritin (0%). The study showed no interference for drugs used in this work: nitrofurantoin, metronidazole, paracetamol and acyclovir but suggests that in specific concentrations and incubation time, cyprofloxacin did affect the results.

KEYWORDS – Ferritin measurement; microparticle enzyme immunoassay; sensibility; specificity.

INTRODUÇÃO

As ferritinas são as principais proteínas envolvidas no armazenamento de ferro, sendo encontradas no meio intracelular nos tecidos, mas também trata-se de um constituinte normal do plasma, fluídos corporais e das hemácias circulantes (Addison *et al.*, 1972).

Ferritinas derivadas de diferentes tecidos de algumas espécies apresentam distintas propriedades como: estrutura primária, teor de fosfato no núcleo mineral, mobilidade eletroforética e proporção relativa de subunidades H e L, determinando assim diferenças estruturais, em ponto isoelétrico e capacidade oxidativa

(Munro & Linder, 1978; Treffry *et al.*, 1987; Aisen & Listowski, 1980).

Estudos demonstram a relação direta entre a concentração de ferritina no soro e os estoques de ferro nos tecidos, sendo utilizado como um parâmetro auxiliar no diagnóstico da deficiência de ferro. Níveis séricos usualmente apresentam-se aumentados em pacientes com doenças inflamatórias, como por exemplo, na artrite reumatóide, o que pode acarretar comprometimento na avaliação dos níveis reais de ferro intracelular. Elevações também podem ser um indicador não específico de patologias graves em curso, como carcinoma hepatocelular, leucemias, doença de Hodgkin's,

Recebido em 6/11/2003

Aprovado em 4/3/2004

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná - Curitiba (PR), Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná - Curitiba (PR), Brasil.

câncer de cabeça e pescoço, bem como em doenças re- nais, na AIDS e outras infecções e inflamações sistêmi- cas (Lee & Means, 1995).

Vários agentes endógenos e xenobióticos redutores têm capacidade de liberar Fe^{2+} da ferritina (Fe^{3+}) *in vitro* (Monteiro *et al.*, 1989; Funk *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1978), inclusive o Ala (Oteiza *et al.*, 1995), sendo alguns destes produtos utilizados como medicamen- tos. Outros medicamentos são conhecidos por promo- verem danos à proteínas, sendo alguns deles utiliza- dos de forma contínua como o aciclovir nos casos de AIDS, paracetamol nos casos de dores reumáticas crô- nicas, ou mesmo a ciprofloxacina, além de uso comum na terapia antimicrobiana, também é indicada atual- mente na profilaxia e tratamento das infecções causa- das pelo *Bacillus anthracis*, utilizado como arma bioló- gica (Melo, 1999; CDC, 2001).

Os sistemas comerciais disponíveis para a dosa- gem de ferritina plasmática nos laboratórios clínicos estão baseados em ensaios imunoenzimáticos, immu- quimioluminescentes, radioimunoenzimáticos e immu- absorventes, utilizando anticorpos antiferritina especí- ficos.

Este trabalho tem por objetivos avaliar se a meto- dologia de enzimmunoensaio com micropartículas do sistema ASXYM – *Abbott Laboratories*, apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para de- tectar alterações plasmáticas de concentrações de fer- ritina, também decorrentes de lesões teciduais, espe- cialmente hepáticas, que promovam extravasamen- to de ferritina intracelular, considerando que as rea- ções utilizando anticorpos monoclonais de baço ou fígado de animais ou humano, observadas nas eta- pas de desenvolvimento dos testes, poderiam ser afe- tadas por possível variação na estrutura da apoproteína, em função da origem dos tecidos. E, ainda, se alguns fármacos de uso comum em processos infec- ciosos e inflamatórios (alguns deles utilizados para pacientes onde se verifica aumento da concentração de ferritina) poderiam, em concentrações terapêuti- co-plasmática, afetar os resultados obtidos com esta metodologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Ferritina de fígado humano (Tipo IV - *Sigma – Aldrich*, Inc. F6754).

Ferritina de baço humano (Tipo V - *Sigma-Aldrich*, Inc. F6879).

Ferritina de coração humano (Tipo VII - *Sigma- Aldrich*, Inc. F4131).

Reagentes

Reagentes que compõem o sistema para dosagem de ferritina plasmática (*AXSYM Abbott Laboratories*).

Soro controle liofilizado *BIO-RAD* nível 2 lote 40092, na concentração de 187,0 (149-224) ng/ml de ferritina plasmática.

Fármacos

Metronidazol – grau de pureza 99,3% (*Parke Da- vis*), paracetamol – grau de pureza 100% (*Sigma Aldri- ch*), nitrofurantoína – grau de pureza 99,1% (*Famita- lia Carlo Erba*), aciclovir – grau de pureza 99,0% (*Par-*

ke Davis) e ciprofloxacina – grau de pureza 99,7% (*Sig- ma Aldrich*).

Preparo das soluções de ferritinas

Foram preparadas soluções de ferritinas, individuais e em misturas, utilizando-se como diluente de amos- tras o tampão Tris, fornecido pelo sistema comercial, contendo agente surfactante, estabilizadores de proteí- nas e azida sódica como conservante. As ferritinas in- dividuais de fígado, baço e coração foram preparadas nas concentrações de 20, 150, 400 e 600ng/ml, bem como as soluções contendo ferritinas de fígado/baço, fígado/ coração e baço/coração, na proporção de 1:1, também preparadas em concentrações finais de 20, 150, 400 e 600ng/ml. Utilizamos, ainda, soluções contendo ferriti- nas de baço/fígado/coração na proporção de 1:1:1, nas mesmas concentrações anteriormente descritas.

Tratamento de soro controle contendo ferritina com soluções de fármacos

O soro controle liofilizado, contendo ferritina plas- mática na concentração de 187,0 ($\pm 37,0$)ng/mL, foi re- constituído em volume de água deionizada e homoge- neizado conforme condições indicadas pelo protocolo do fabricante. Em preparações contendo alíquotas de 1900 μ l do soro controle foram adicionados, separada- mente, 100 μ l das soluções dos fármacos. As soluções resultantes, com volume final de 2000 μ l, contêm me- tronidazol, paracetamol, aciclovir, e nitrofurantoína em concentrações de 50, 100, 200, 400 e 600 μ mol/l. As so- luções de ciprofloxacina resultaram em concentrações molares de 5, 10, 30, 50 e 100 μ mol/l. Para a ciprofloxa- cina foi preparada uma solução adicional na concen- tração de 600 μ mol/l, misturada em igual volume com o soro controle na proporção de 1:1, com volume final de 2000 μ l.

Dosagem imunoenzimática de ferritinas

Utilizando a metodologia do sistema comercial *AxSYM system – Abbott Laboratories*, baseado em en- saios imunoenzimáticos com micropartículas, foram rea- lizadas dosagens de ferritina nas soluções contendo ferritinas individuais de baço, fígado e coração, como também nas soluções contendo misturas das ferritinas. As soluções contendo ferritina plasmática, tratadas com fármacos, assim como os soros contendo ferritina uti- lizados como controles e brancos, foram incubados até 72 horas em banho-maria 37°C. Destas preparações foram retiradas alíquotas para dosagens de ferritina nas soluções testes, controles e brancos após incubação de 1, 4, 8, 24, 48, e 72 horas. Para a ciprofloxacina na con- centração de 600 μ mol/l foi retirada uma alíquota com 72 horas.

RESULTADOS

Dosagens de ferritinas teciduais

Os resultados com a dosagem de ferritinas indivi- duais utilizando-se ferritinas humanas de coração, fi- gado e baço são apresentados na Fig. 1. Para as mistu- ras de ferritinas os resultados podem ser observados nas Figuras 2 e 3.

Efeitos de fármacos sobre a ferritina plasmática humana

Os resultados dos experimentos realizados com o

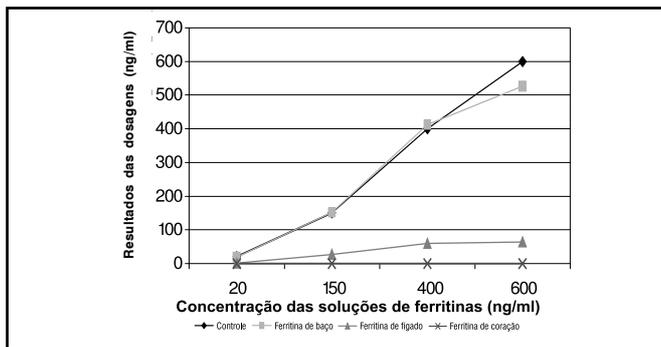


FIG. 1 - Dosagens de ferritinas de diferentes tecidos em concentrações variáveis.

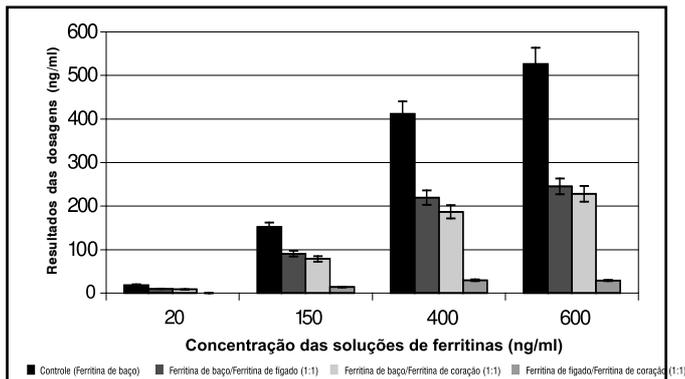


FIG. 2 - Dosagens de soluções contendo combinações de ferritinas de dois diferentes tecidos em concentrações variáveis.

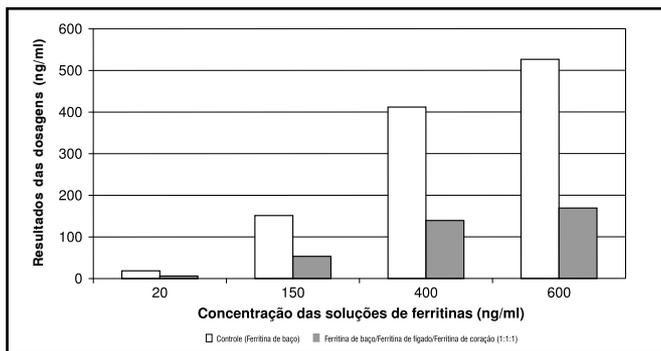


FIG. 3 - Dosagens de soluções contendo combinações de ferritinas de três diferentes tipos de tecidos em concentrações variáveis.

Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídas em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com microparticulas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 experimentos independentes. ($n=15$ e $p<0,05$).

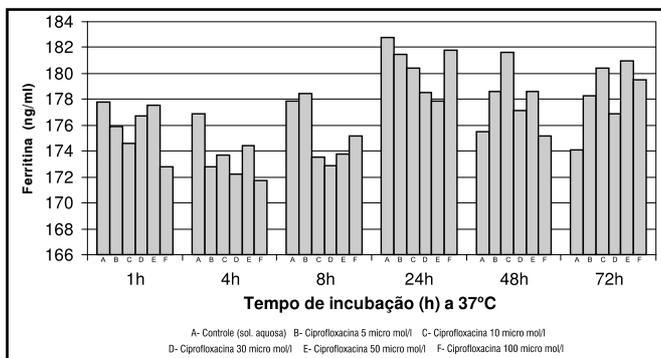


FIG. 4 - Efeitos da incubação com ciprofloxacina sobre a dosagem de ferritina plasmática humana.

Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ($187,0 \pm 38,0 \text{ ng/mL}$) contendo ciprofloxacina nas concentrações de 5, 10, 30, 50 e $100 \mu\text{mol/L}$ e tempos de incubação a 37°C , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com microparticulas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 experimentos independentes ($n=15$ e $p<0,05$).

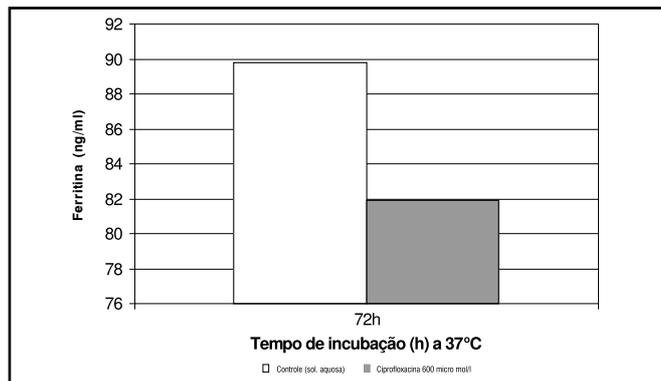


FIG. 5 - Efeitos da incubação com ciprofloxacina (600mmol/l) sobre a dosagem de ferritina plasmática humana.

Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ($93,5 \pm 19,0 \text{ ng/mL}$) contendo ciprofloxacina na concentração de $600 \mu\text{mol/l}$ e tempo de incubação a 37°C , durante 72h, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com microparticulas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 experimentos independentes ($n=15$ e $p<0,05$).

objetivo de identificar possível interferência da nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol e aciclovir, na metodologia de dosagem da ferritina plasmática, não indicaram alterações estatisticamente significativas e não são apresentados. Os resultados dos experimentos com a ciprofloxacina são apresentados nas Figuras 4 e 5.

DISCUSSÃO

Análise da especificidade e sensibilidade do meio (Axsym – Abbott Laboratories) para dosagens de ferritinas de órgãos diferentes.

Na primeira etapa do trabalho, quando se avaliou a especificidade do método frente a ferritinas de baço, fígado e coração, os resultados indicaram que, entre as ferritinas testadas, houve especificidade do método para a ferritina de baço (Fig. 1). Os dados mostram percentuais de quantificação para a ferritina de baço próximos de 100%, indicando a alta relação entre a concentração utilizada e a quantificada pelo método, mesmo havendo um melhor desempenho para as concentrações intermediárias (150 e 400ng/ml) e caindo para 93% e 96% quando utilizou-se concentrações de 20ng/ml e 600ng/ml respectivamente. Os resultados para as dosagens de ferritina de fígado, também representados na Fig. 1, indicaram que o sistema quantificou de 10% a 18% dos valores totais da concentração utilizada de ferritina de fígado. Estes resultados, de certa forma, permitem questionamentos sobre a capacidade do sistema em reconhecer adequadamente a ferritina plasmática. Se considerarmos que os componentes imunológicos da metodologia, como descrito anteriormente, não reconheceram quantitativamente a ferritina de fígado que apresenta similaridades com a ferritina de baço, utilizada como padrão pela metodologia, fica a dúvida se reconheceria a ferritina plasmática, que também é sintetizada no fígado e ainda contém um componente glicosilado, cujo aumento na concentração, em casos de hepatoma, é atribuído ao aumento da síntese de ferritina plasmática. Estudos devem ser conduzidos no sentido de esclarecer esta aparente discordância, apesar do sistema, que utiliza ferritina de baço como referência, quantificar a ferritina plasmática no soro controle.

Para as dosagens de ferritina de coração, os resultados obtidos (Fig. 1) em comparação com as concentra-

ções utilizadas, foram próximos a zero (0%). Estes valores indicam, provavelmente, que o anticorpo utilizado pela metodologia não é capaz de reconhecer a ferritina de coração, não ocorrendo a formação do complexo antígeno-anticorpo aderido às micropartículas e, conseqüentemente, não permitindo a continuidade do processo de quantificação.

Os mesmos aspectos de reconhecimento de ferritinas de coração e fígado foram observados nos resultados das dosagens de ferritinas utilizando-se misturas de duas ferritinas humanas de órgãos diferentes. Pode-se observar na Fig. 2 que, na mistura contendo ferritina de baço e ferritina de coração, somente a de baço é reconhecida, sendo quantificada cerca de 50%, correspondendo ao total de ferritina de baço adicionada à mistura. Nas misturas contendo ferritinas de baço e fígado os percentuais de reconhecimento aumentaram cerca de 10%, correspondendo aos valores da ferritina de baço acrescidos de parte dos valores de ferritina de fígado, que é quantificada em torno de 10%. Nas misturas de ferritinas de fígado e coração, somente em torno de 10% do total de ferritinas adicionadas à mistura foram quantificados, correspondendo provavelmente a ferritina de fígado. Estes resultados confirmam os resultados obtidos para as ferritinas individuais, apresentados anteriormente.

Nas soluções contendo os três tipos de ferritinas teciduais, conforme resultados apresentados na Fig. 3, verificou-se que o sistema quantificou apenas em torno de 30% do total adicionado, valor equivalente a quantidade de ferritina de baço presente na mistura, com pequenas variações devidas, provavelmente à ferritina de fígado que é quantificada em 10%. A Fig. 3 mostra também que as ferritinas não reconhecidas adequadamente pelos anticorpos utilizados na metodologia não causam interferência na dosagem do constituinte que é quantificado pelo sistema (ferritina de baço), confirmando a especificidade do sistema.

Análise dos efeitos de fármacos sobre a dosagem de ferritina plasmática humana

No presente estudo não foram observados resultados com variações significativas que sugiram a interferência na metodologia da nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol ou aciclovir, utilizando-se as concentrações de 50 a 600 µmol/l e tempos de incubação nas diferentes concentrações. As alterações observadas ainda encontram-se dentro dos coeficientes de variação da metodologia apresentados pelo fabricante (até 6,59%), bem como do desvio padrão aceitável para a concentração de ferritina no soro controle (187,0 ± 38,0 ng/ml). As concentrações dos fármacos foram utilizadas dentro dos parâmetros terapêuticos, observando diferenças e extremos possíveis nos níveis de concentração terapêutica plasmática que permitissem avaliar esta variante. No experimento utilizando-se a ciprofloxacina nas concentrações entre 5 e 100 µmol/l, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Fig. 4). Com o objetivo de verificar se alterações na relação fármaco / proteína poderiam acarretar interferências significativas na metodologia, utilizou-se a ciprofloxacina a 600 µmol/l, equivalendo a uma concentração plasmática de 231,6 µg/ml, e uma concentração de ferritina de 93,5 ± 19,0 ng/ml, observou-se uma diminuição nos resultados de cerca

de 10%, conforme indicado na Fig. 5, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos nos experimentos relatados e discutidos anteriormente, e as informações do levantamento bibliográfico, pode-se apresentar as seguintes conclusões:

a) A metodologia para a dosagem de ferritina plasmática, utilizando enzimaímmunoensaio com micropartículas e anticorpos monoclonais, quando testada frente à ferritinas de coração, fígado e baço, apresentou especificidade e sensibilidade para ferritina de baço, não quantificando adequadamente as outras duas ferritinas testadas;

b) Considerando a especificidade dos anticorpos monoclonais e os dados que se obteve nas dosagens de ferritina de fígado com a metodologia em estudo (quantificando apenas 10% da concentração), elevações na concentração de ferritinas no plasma, decorrentes de lesão hepática com extravasamento de ferritina intracelular, não pode ser mensurada satisfatoriamente pelo método;

c) No estudo de possíveis interferências na metodologia causadas por fármacos (nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina) em concentrações próximas à terapêutica, não foram observados resultados com variações significativas que sugiram a interferência na metodologia em determinadas concentrações, relação fármaco / ferritina e tempos de incubação em ensaios *in vitro*. Utilizando ciprofloxacina na concentração de 600 µmol/l, observou-se uma variação nos resultados cerca de 10% menores em relação ao controle, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$), para uma relação fármaco/proteína de 3,2 mol/g, indicando uma possível interferência desta relação nos resultados obtidos e sugerindo a possibilidade deste medicamento poder afetar a estrutura desta proteína nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

1. Abbott Laboratories. (1998) Ferritin - Axsym system. Informe técnico.
2. Addison, G.M.; Beamish, M.R.; Hales, C.N. (1972) An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology*, n. 25, p. 326-329.
3. Aisen, P.; Listowsky, I. (1980) Iron transport and storage proteins. *Annual Review of Biochemistry*, n. 49, p. 357-393.
4. Cdc - Center For Disease Control And Prevention-Usa (2001). Update: investigation of anthrax associated with intentional exposure and interim public health guidelines, october 2001. *MMWR* 2001, n. 50, p. 889-897.
5. Funk, F.; Lenders, J.P.; Crichton, R.R.; Schneider, W. (1985) Reduction and mobilisation of ferritin iron. *European Journal of Biochemistry*, n. 152, p. 167-172.
6. Jones, T.; Spencer, R.; Walsh, C. (1978) Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavins analogues. *Biochemistry*, n. 17, p. 4011-4017.
7. Lee, M.H.; Means, R.T. Jr. (1995) Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. *American Journal of Medicine*, n. 98, p. 556-571.
8. Melo, J.M.S. (Ed) (1999) *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas: DEF 1999/2000*. 28ª ed. Ed. Publicações Científicas. Rio de Janeiro. p. 201-636.
9. Monteiro, H.P.; Vile, G.F.; Wnterbourm, C.C. (1989) Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl and nitroaromatic radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, n. 6, p. 587-591.
10. Munro, H.N.; Linder, M.C. (1978). Ferritin: structure, biosynthesis and role in iron metabolism. *Physiology Review*, n. 58, p. 317-396.
11. Oteiza, P.I.; Kleinman, C.G.; Demasi, M.; Bechara, E.J.H. (1995) 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n. 316, p. 607-611.
12. Treffry, A.; Harrison, P.M.; Cleton, M.I.; Debruijn, W.C.; Mann, S. (1987) A note on the composition and properties of ferritin iron cores *Journal of Inorganic Biochemistry*, n. 31, p. 1-6.

Endereço para correspondência
Sandro Lunedo

Rua Gonçalves Dias, 395 - ap. 52 - Curitiba - PR - 80240-340
Tel/Fax: (0xx41)343-0798 - e-mail: slunedo@brturbo.com.br

Quantificação da ploidia de DNA em neoplasias intra-epiteliais e invasivas do epitélio escamoso do colo uterino, utilizando sistema de análise computadorizado de imagens - estudo de casos em Recife - PE*

DNA ploidy quantification in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma by computer image analyse in cases of Recife - PE

Ana Maria de Ataídes Romaguera¹, Carlos Eduardo de Queiroz Lima^{2,7}, Diógenes Luis da Mota^{2,3}, Alexandre Motta Bittencourt², Jean Batista de Sá⁴, Alexandre S. Casimiro Onofre⁵ & Alex Benício da Silveira⁶

RESUMO – No Brasil, o câncer de colo uterino é a segunda neoplasia maligna feminina mais freqüente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sendo uma das maiores incidências verificada no Recife. Os padrões aneuplóides de DNA são considerados um fator geralmente associado à malignidade sendo encontrados em diferentes graus de displasias. Os carcinomas da cérvix uterina geralmente exibem células nas quais o conteúdo de DNA está desviado significativamente do normal. Com o objetivo de determinar e quantificar possíveis variações do conteúdo do DNA nuclear, estudamos 32 neoplasias do epitélio escamoso do colo uterino, sendo 26 de carcinoma *in situ* e 6 de carcinoma invasivo. Os cortes histológicos foram submetidos à reação histoquímica de Feulgen, para marcação dos núcleos. O conteúdo de DNA de linfócitos foi estabelecido como padrão normal, diplóide, para comparação com o conteúdo de DNA das células neoplásicas e construção dos histogramas de ploidia de DNA entre essas células. Dos 32 casos avaliados, tanto as lesões intra-epiteliais como as invasivas, exibiram um padrão aneuplóide de DNA. A presença da aneuploidia de DNA nas lesões intra-epiteliais sugere uma provável evolução dessas lesões para o caráter invasivo da doença.

PALAVRAS-CHAVE – Neoplasias uterinas, ploidia de DNA, citometria.

SUMMARY – Uterine cervical cancer is the second most frequent female malignant neoplasia in Brazil, and it is more frequent in the North, Northwest and Center regions of the country, and one of the highest incidence noticed in the Recife city. DNA aneuploid pattern is generally related to malignancy, and are also present in different grades of dysplasia. Cervical cancer usually contains cells in which the DNA content are significantly deviated from the normal. The aim of this study was to determine possible DNA content variations among 32 cases of squamous cell neoplasia of uterine cervix (26 cases "in situ" carcinoma and 6 cases invasive squamous cell carcinoma). The histological sections were submitted to the Feulgen histochemical reaction for nuclear dye. Lymphocytes were used as internal control related to the normal DNA content, diploid, for comparison with the DNA content of the neoplastic cells by means of histograms interpretation. Among the 32 cases, both, intraepithelial and invasive lesions, showed the abnormal DNA content pattern known as aneuploidy. This pattern among the intraepithelial lesions suggests future progress of this lesions to malignant disease.

KEYWORDS – Cervical neoplasia, DNA content, cytometry.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer do colo de útero figura como a segunda neoplasia maligna feminina mais freqüente, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, só sendo superado pelos casos de câncer de mama que prevalecem nas regiões Sul e Sudeste, além de ser a segunda causa de morte, por câncer na mulher. Uma das maiores incidências de carcinomas do colo uterino verifica-se justamente no Recife^{1,12}.

Segundo Fu⁹, Bibbo², De May⁶, padrões aneuplóides de DNA (quantidade anormal de DNA, ou seja $\neq 2C$ e seus múltiplos) são considerados um fator geralmente associado à malignidade, sendo também encontrados em diferentes graus de displasias, incluindo os casos

de displasias leves. A ploidia das lesões tem se mostrado como um fator estatisticamente preditivo no comportamento biológico das lesões^{15;5}.

Os dados indicam, geralmente, um prognóstico ruim nos tumores aneuplóides que são relacionados à menor sobrevida e tempo de recorrência⁴. No entanto, os resultados da análise do DNA não devem ser usados como única base para decisões clínicas, devendo ser associados à parâmetros clínicos e laboratoriais^{3;4;11}.

De acordo com McDermott *et al.*¹⁴, na cervix uterina, a presença de aneuploidia é estimada em 75 a 100% dos casos de NIC em pacientes com lesões de alto grau. Se a aneuploidia fosse identificada próxima às lesões de alto grau poderia ser potencialmente valiosa na avaliação global de esfregaços cervicais de pacientes com diagnósticos citológicos difíceis.

Recebido em 30/12/2003
Aprovado em 27/4/2004

*Trabalho realizado no Lab. de Imagem do Programa de Pós-Graduação em Morfologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco
¹ Prof. M. Sc. Dept. de Biologia/UPE; ² Prof. Dr. Programa de Pós-Graduação em Morfologia/UFPE; ³ Dept. de Ciências Morfológicas/ICB-UPE; ⁴ Mestre em Morfologia/UFPE; ⁵ Mestre em Patologia/UFMG; ⁶ Programa de Pós-Graduação em Morfologia/UFPE; ⁷ Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS-UFPE.

O perfil da ploidia do DNA pode ser um indicador útil no prognóstico das neoplasias intra-epiteliais cervicais. De acordo com Hanselaar *et al.*,¹⁰ lesões com padrões aneuplóides do DNA têm sido relacionadas com altas taxas de persistência ou recorrência em relação às lesões com diploidia (2C) ou poliploidia (4C, 8C).

Segundo Leeuwen *et al.*,¹³ aneuploidia é um marcador de malignidade e em lesões neoplásicas intra-epiteliais cervicais, aquelas que apresentam padrão aneuplóide provavelmente persistem ou progredem à malignidade enquanto às lesões diplóides ou poliplóides regressam. Alguns autores sugerem que a citometria do DNA consiste em uma eficaz ferramenta para o diagnóstico de casos equívocos, quando a meta é diferenciar alterações de reações inflamatórias de neoplasias.¹³

Este estudo teve como objetivo, quantificar por meio da análise de imagem computadorizada, a ploidia de DNA em células neoplásicas de lesões intra-epiteliais e invasivas do colo uterino no Recife.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 32 casos de neoplasias de colo uterino, *in situ* e invasivo, selecionados do Arquivo do Centro Integrado de Anatomia Patológica (CIAP), do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), da Universidade de Pernambuco (UPE), em Recife. O material foi obtido a partir de biópsias cirúrgicas e fragmentos de biópsias dirigidas e selecionadas aleatoriamente, previamente emblocados em parafina, a partir dos quais foram feitos cortes de 5µm de espessura.

Foram feitos dois cortes de cada bloco parafinado, sendo um submetido à rotina de coloração pelo H.E. e outro à reação histoquímica de Feulgen⁸, de acordo com os procedimentos constantes no protocolo do kit, gentilmente cedido pela Merck.

As determinações quantitativas do DNA foram realizadas para cada amostra em 100 núcleos de células neoplásicas e 100 núcleos de linfócitos (como controle) escolhidos ao acaso por toda a extensão da lâmina. As determinações quantitativas do DNA foram feitas utilizando-se um sistema de Análise de Imagem Microscópica, Image Lab 2000 Plus (Softium Informática).

RESULTADOS

A mediana da densidade ótica dos linfócitos foi estabelecida como correspondente a 2C (diplóide), com valores entre 1.84 a 2.07C e daí, distribuídos os intervalos para construção dos histogramas de distribuição do DNA.

O conteúdo do DNA foi quantificado em preparações histológicas de 32 neoplasias de colo uterino, sendo 26 casos de NIC III e 6 de carcinoma invasivo. Todos apresentaram padrão aneuplóide de DNA com valores acima de 2.07C, (Fig. 1). Dentre os aneuplóides, 13 dos NIC III apresentaram um pico tetraplóide, bem como em 3 dos 6 casos de carcinomas invasivos, com valores entre 2.3 a 2.53C.

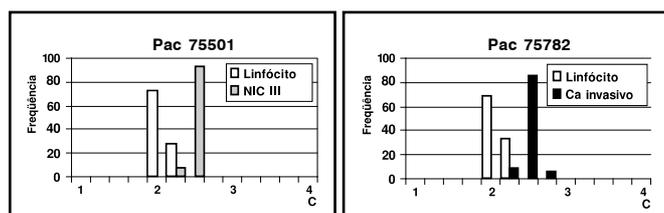


FIG. 1 - Histogramas dos canais de ploidia de DNA em linfócitos (branco), em lesões intra-epiteliais (cinza) e em lesões invasivas (preto).

DISCUSSÃO

Fu *et al.*,⁹ Dudzinski *et al.*,⁷ e Hanselaar *et al.*¹⁰, em um estudo retrospectivo em neoplasias intra-epiteliais cervicais, demonstraram que em 85% de todas as lesões que regrediram espontaneamente eram diplóides, 95% das lesões que persistiram ou progrediram para formas mais severas da neoplasia, eram aneuplóides e 100% das lesões que progrediram para o câncer invasivo eram aneuplóides. A associação da progressão das lesões e a malignidade pode implicar em um prognóstico ruim para as lesões pré-malignas com aneuploidia.

Na cérvix uterina, a presença da aneuploidia em lesões intra-epiteliais está bem correlacionada com o grau dessas lesões, estando presente em 75 a 100% das pacientes com lesões de alto grau.¹⁴

Bibbo *et al.*,² avaliaram o perfil da ploidia do DNA como indicador prognóstico em 211 pacientes com biópsias de lesões intra-epiteliais. Concluindo que nas lesões com um padrão poliplóide, o retorno ao normal é mais freqüente que naquelas com padrão aneuplóide. Dos 211 casos, cerca de 38% tinham DNA poliplóide e 62% eram aneuplóides, mas em todos os casos que regrediram, 86% eram poliplóides e apenas 14% eram aneuplóides. Dos 130 casos classificados como aneuplóides, 95% permaneceram estáticos ou progrediram e apenas 5% regrediram.

Como conclusão, constatamos que a freqüência da aneuploidia foi de 100% nas lesões avaliadas, portanto, a comparação entre a ploidia em carcinomas *in situ* (NIC III) e invasivos, não apresentou diferença, o que sugere que a aneuploidia é um indicativo de progressão para malignidade nas NIC III, já que estas apresentaram o mesmo padrão de ploidia de DNA verificado nas lesões invasivas.

REFERÊNCIAS

1. Abrão, F.S. Câncer Ginecológico: perspectivas. *Acta Oncol Bras*, São Paulo, v.14, n. 2, p.70-79, 1994.
2. Bibbo, M. *et al.* DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol*, Illinois, v.92, n. 3, p. 261-265, 1989.
3. Carey, F.A. Measurements of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. *J Pathol*, Sussex, v.172, n.4, p.307-312, 1994.
4. Cohen, C. Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol*, Philadelphia, v. 27, n.5, p.482-493, 1996.
5. De May, Richard M. Cytopathology of false negatives preceding cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, St Louis, v.175, n. 4, Part 2, p.1110-13, 1996.
6. De May, Richard M. The Pap Smears. In: *The Art and science of cytopathology. exfoliative cytology*. Chicago, Ed. ASCP 1998. p.61-205.
7. Dudzinski, M.R. *et al.* DNA content in cervical neoplasia and its relationship to prognosis. *Obstet Gynecol*, St. Louis, V. 69, n. 3, Part 1, p. 373-377.
8. Feulgen, R.; Rossenbeck, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinaure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernen in mikroskopischen preparaten. *Hoppe Seyler. Physiol Chem*. v.135, p.203-248, 1924.
9. Fu, Y.S.; Reagan, J.W.; Richart, R.M.. Definition of precursors. *Gynecol Oncol*, New York, 12: 220-231, 1981.
10. Hanselaar, A.G.J.M.; Vooijs, G.P.; Oud, P.S.; Pahlplatz, M.M.M.; Beck, J.L.M. DNA ploidy patterns in cervical intraepithelial neoplasia grade III, With and without synchronous invasive squamous cell carcinoma. *Cancer*, Philadelphia, v.62, p.2537-2545, 1988.
11. Haroske, G. *et al.* Part I: Basic considerations and recommendation for preparation, measurements and interpretation. *Anal Cell Pathol*, Amsterdam, v. 17, p.189-200, 1997.
12. Instituto Nacional do Câncer. (Brasil). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2000. Rio de Janeiro. Disponível em: < http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa_2003/sintese.html >. Acesso em: 9 de outubro de 2003.
13. Leeuwen, A.M. *et al.* The suitability of DNA cytometry for the prediction of the histological diagnosis in women with abnormal cervical smears. *Br J. Obstet Gynecol*, Paris, v.103, p. 359-365, 1996.
14. McDermott, N. *et al.* Ploidy profile of morphologically normal squamous epithelium adjacent to high grade cervical intra epithelial neoplasia. *Br J. Obstet Gynecol*, Paris, v.104, p. 623- 625, 1987.
15. Rodenburg, C. *et al.* Tumor ploidy as major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer*, Philadelphia, v.59, n.2, p. 317-323, 1987.

Endereço para correspondência

Prof. Carlos Eduardo de Queiroz Lima

Rua Min. Nelson Hungria, 414 - Aptº 301 - Boa Viagem - Recife/PE - 51020-100

E-mail: ceql@uol.com.br

Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas

Recent concepts in the activation of complement system and biological properties

Shirley Ramos da Rosa Utiyama*, Iara Taborda de Messias Reason* & Lorete Maria da Silva Kotze**

RESUMO – O sistema complemento é formado por aproximadamente 35 proteínas e glicoproteínas distribuídas no plasma, outros líquidos biológicos e superfícies celulares. Essas proteínas atuam em uma reação sequencial em cascata e representam um dos principais mediadores da defesa inata do hospedeiro e da inflamação. A ativação do sistema complemento tanto pode ser benéfica para o hospedeiro, como na resistência a microrganismos invasores, como pode ser deletéria em uma variedade de doenças imunopatologicamente mediadas. O complemento pode ser ativado por qualquer das três vias, a via clássica, dependente de anticorpo, a via alternativa ou a, recém-descrita, via das lectinas (MBL). As conseqüências biológicas da ativação do complemento são principalmente a defesa contra infecções piogênicas, a interação entre imunidade inata e adaptativa e a remoção de complexos-imunes e produtos da injúria tecidual. O complemento reconhece, opsoniza ou lisa partículas, incluindo bactérias, leveduras e outros microrganismos, restos celulares e células alteradas do hospedeiro. Há também evidências de que o complemento contribui significativamente na regulação da resposta imune. O principal objetivo da presente revisão é fornecer uma visão atual da ativação e das propriedades biológicas desse sistema, enfatizando sua importância na resposta imune inata e na homeostasia do hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE – Sistema complemento; via clássica; via alternativa; via das lectinas.

SUMMARY – The complement system is formed of about 35 proteins and glycoproteins distributed in blood plasma, other body fluids and on cell surfaces. These proteins acting within a cascade-like reaction sequence, representing a major mediator of host innate immune defence and inflammation. Activation of the complement system can either be beneficial to the host, as in resistance to invading microorganisms, or it can be detrimental in a variety of immunopathologically mediated diseases. Complement can be activated by any of the three pathways, either the antibody-dependent classical pathway, the alternative pathway, or the recently discovered MBL (mannan binding lectin) pathway. The biological consequences of complement activation are mainly the defense against pyogenic bacterial infection, bridging between innate and adaptive immunity and the clearance of immune complexes and the products of inflammatory injury. The complement recognizes, opsonizes or lyses particulate materials, including bacteria, yeasts and other microorganisms, host cell debris and altered host cells. There is also increasing evidence that complement significantly contributes to the regulation of the immune response. The major aim of the present review is to provide a recent vision about the activation and biological properties of this system, emphasizing its importance in the innate immune defence and internal homeostasis of the host.

KEYWORDS – Complement system; classical pathway; alternative pathway; mannan binding lectin pathway.

INTRODUÇÃO

O sistema complemento é considerado uma das principais vias efetoras da resposta imune e inflamatória, sendo formado por aproximadamente 35 proteínas plasmáticas e associadas a membrana celular que, uma vez ativadas, modulam reações humorais e celulares. Os hepatócitos são a principal fonte das proteínas do complemento do sangue, enquanto macrófagos e fibroblastos são os responsáveis pela síntese local em sítios teciduais (Prodinge *et al.*, 1999; Walport, 2001a).

A ativação enzimática sequencial dos componentes do complemento gera uma cascata biológica similar aos sistemas de coagulação, da fibrinólise e das quininas, o que permite uma resposta amplificada frente aos diferentes estímulos (Porcel; Vergani, 1993). Essa ativação é fundamental na manutenção da homeostase do hospedeiro, contribuindo tanto no combate a microrganismos, quanto na solubilização e remoção de complexos imunes circulantes (Sim, 1992; Volanakis, 1998).

Uma vez ativado, através das vias clássica, alternativa e das lectinas, o complemento pode induzir a várias atividades biológicas decorrentes da interação de seus produtos de ativação com receptores celulares específicos ou pela inserção de complexos protéicos à membrana celular. Essas atividades são de grande importância no processo inflamatório, mediando a quimiotaxia e ativação de fagócitos, com estímulo da síntese de prostaglandinas, liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio (Porcel; Vergani, 1993; Kirschfink, 1997). O complexo de ataque à membrana, C5b-9, formado como o produto final de ativação da cascata, provoca, pela sua inserção na membrana da célula alvo, lise irreversível da mesma e em concentrações subletais induz a liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, existem evidências de que os peptídeos C3a, C5a e C5d possuem atividades imunoregulatórias (Porcel; Vergani, 1993; Volanakis, 1998).

A via clássica faz parte da resposta imune específica do hospedeiro e a sua ativação depende da produ-

Recebido em 19/12/2003

Aprovado em 4/3/2004

*Laboratório de Imunopatologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

**Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva, Hospital Universitário Cajuru, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ção prévia de anticorpos e da formação de complexos antígenos-anticorpos. A via alternativa e a via das lectinas participam da resposta inata, sendo que a sua ativação depende de componentes específicos presentes na superfície dos microrganismos.

Os componentes da via clássica e do complexo de ataque à membrana são numerados de C1 a C9, sendo que C1, C4, C2 e C3 são componentes da via clássica. A via alternativa compreende o fator D, o fator B (BF), o fator P (properdina) e o componente C3. As proteínas da via das lectinas são designadas pelas abreviaturas MBL (lectina ligante de manose) e MASP-1, MASP-2 (MBL-serina proteases associadas). Os componentes C5, C6, C7, C8 e C9 constituem o complexo terminal de ataque à membrana (MAC) (Figura 1). Os fragmentos peptídicos gerados por ativação e clivagem proteolítica são designados por letras minúsculas como, por exemplo, C4a e C4b, resultantes da ativação de C4. Em todos os casos, exceto para C2a e C2b, o fragmento menor tem sempre a letra "a". O fragmento maior "b" permanece ligado a um complexo necessário para o próximo passo da ativação. Componentes inativos são indicados pela letra "i". As proteínas de membrana do sistema complemento são designadas de diferentes formas: tanto pela função que exercem, como por exemplo, fator de decaimento da aceleração (DAF); ou usando sistemas de grupos de diferenciação (exemplo: CD 59); ou ainda simplesmente numerados consecutivamente, como os cinco receptores do complemento, de CR1 a CR5 (Bing; Alper, 1995; James, 1997; Walport, 2001a).

Os receptores do complemento encontram-se bem caracterizados e estão divididos em diferentes categorias funcionais, de acordo com seus ligantes específicos. Destacam-se os receptores para os fragmentos de C3; os receptores para os fragmentos solúveis C3a, C4a e C5a (C3a-R, C4a-R, C5a-R); o receptor para o fator H (fH-R) e ainda os receptores para C1q (C1q-R). Os receptores mais bem estudados são para os fragmentos de C3 (C3b, iC3b, C3dg) que estão covalentemente ligados às superfícies ativadoras. Esses constituem cinco tipos diferentes de receptores, denominados de CR1 a CR5, com diferenças de afinidade para cada ligante. A maioria desses expressa-se, com diferenças de intensidade, em monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, enquanto outros são encontrados apenas em eritrócitos (CR1), linfócitos B (CR1, CR2), linfócitos T (CR1, CR3), células NK (CR3, CR4) e células dendríticas de linfonodos (CR2). Tais receptores estão diretamente envolvidos nos processos de opsonização e fagocitose, bem como na neutralização de vírus e na eliminação de complexos imunes circulantes (Ross, 1992).

Um sistema com o potencial pró-inflamatório e lesivo, como o sistema complemento, requer mecanismos de controle seguros. Aproximadamente metade das proteínas desse sistema atuam no controle das etapas críticas de ativação, em especial naquelas envolvidas com a geração de C3b, visando evitar a destruição de tecidos autólogos. As proteínas regulatórias associadas às membranas expressam-se em uma grande variedade de tecidos (Sim, 1992; Prodinge *et al.*; 1999).

Ativação do sistema complemento

1 - Via clássica

A via clássica foi a primeira a ser descrita e representa um potente mecanismo efetor da imunidade humoral.

O componente C1 é fundamental na ativação da via clássica e consiste em uma proteína multimérica composta de uma molécula de C1q ligada não covalentemente a duas moléculas de C1r e duas de C1s, estabilizadas na presença de íons cálcio (Roitt, Brostoff, Malle, 1996).

Fisiologicamente, a ativação da via clássica tem início com a ligação da molécula C1q a complexos imunes contendo IgG ou IgM, ou a agregados de IgG (*in vitro*). As subclasses IgG₃ e IgG₁ são ativadores mais eficientes que IgG₂ e IgG₄. Além disso, outros ativadores de C1q que independem das moléculas de imunoglobulinas têm sido descritos, os quais compreendem principalmente: lipopolissacarídeos bacterianos, algumas espécies de micoplasma, vírus como EBV e HIV, parasitas como Entamoeba, compostos polianiónicos e proteína C reativa, entre outros (Prodinge *et al.*, 1999). Produtos de lesão tecidual, como membrana mitocondrial e outras membranas subcelulares, filamentos citoplásmicos, polinucleotídeos e componentes de mielina também têm demonstrado ação ativadora sobre C1 (Sim, 1992).

A interação do anticorpo específico com o antígeno induz alterações conformacionais na região Fc da molécula de imunoglobulina, que levam a sua ligação à molécula C1q. Pelo menos, duas moléculas de IgG ou uma de IgM são requeridas para desencadear a ativação de C1q, através da ligação de, no mínimo, duas de suas extremidades globulares às moléculas de imunoglobulinas. A interação de C1q com a IgG ocorre via domínio Cg2 e com IgM através do domínio Cμ3 da região Fc, resultando em uma alteração conformacional da molécula de C1q e ativação sequencial de C1r e C1s (James, 1997; Reid, 1998).

A molécula C1s, uma vez ativada, cliva e ativa tanto o componente C4, em C4a e C4b, assim como C2, em C2a e C2b, através de uma reação dependente de magnésio. Os fragmentos C4a e C2b são subprodutos do processo de ativação. Enquanto C4a tem baixa atividade quimiotática, C2b exibe atividade de cinina. Embora grande parte das moléculas de C4b reajam com a H₂O e se percam, aproximadamente 5% dessas ligam-se, covalentemente, às superfícies ativadoras na proximidade do foco do complexo de ativação (anticorpo-C1q). Após C4b ligar-se ao alvo, tanto este pode agir como uma opsonina, como pode ocorrer sua ligação com o fragmento C2a, gerando assim a enzima C4b2a, que constitui a C3 convertase da via clássica. Essa cliva a molécula de C3, em C3a e C3b (Prodinge *et al.*, 1999).

Dentre as proteínas do sistema complemento, o componente C3 é o que se encontra em maior concentração no soro (1 a 1,4mg/ml), sendo uma das proteínas mais abundantes no plasma. Sua ativação tem um papel central e comum às três vias da cascata do complemento (Fig. 1). Embora algumas proteases, como a plasmina, ou toxinas como o veneno de cobra, possam atuar sobre C3, as C3 convertases da via clássica e da via alternativa são as únicas enzimas fisiologicamente relevantes na ativação de C3.

O peptídeo C3a, resultante da clivagem de C3, é uma potente anafilatoxina, que pode atuar à distância do sítio de ativação de C3. Por sua vez, a molécula C3b, através da exposição de grupamentos internos tioester, pode formar ligação covalente com o antígeno (superfície ativadora) ou com receptores em superfícies próximas (exemplo: eritrócito), assim como com mo-

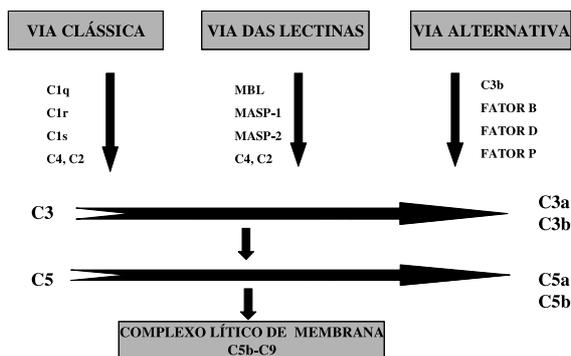


FIG. 1 - Vias de ativação do complemento.

léculas de H_2O . Aproximadamente 10% do C3b nascente liga-se ao ativador, o restante ao reagir com a H_2O , difunde-se no meio (Sim, 1992; Proding, 1999).

Além de C3b atuar como uma forte opsonina sobre as partículas alvo, forma ainda o complexo C4b2a3b, que é a enzima C5 convertase. Essa vai atuar na última etapa de ativação da via clássica, com a clivagem de C5 em C5a e C5b (Fig. 1). Enquanto C5a representa uma das anafilatoxinas mais potentes, a ligação de C5b a C6 dá início à via efetora final da cascata do complemento, até a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (Sim, 1992; Bing; Alper, 1995).

2 - Via alternativa

A via alternativa representa uma das primeiras linhas de defesa natural contra microrganismos. Uma ativação eficiente e uma amplificação instantânea dessa via depende da disponibilidade de uma superfície ativadora, tal como a parede celular bacteriana, de fungos e leveduras, lipopolissacarídeos bacterianos, toxinas, células infectadas por vírus e eritrócitos de coelho (Glovsky, 1994; James, 1997).

O fator B (BF) tem um papel central na ativação da via alternativa. Esse consiste em uma serina protease de cadeia simples, homóloga a C2. A ligação de BF ao C3b envolve múltiplos sítios da molécula, que servem como subunidade catalítica das C3 e C5 convertases da via alternativa (Volanakis, 1998).

A ativação da via alternativa tem início com a ligação covalente de C3b a uma célula alvo. O questionamento inicial era a geração do primeiro C3b, considerando ser uma via independente de anticorpo. Estudos *in vitro* mostraram que a molécula nativa de C3, na circulação, sofre hidrólise espontânea e contínua. Uma ponte de tioéster da molécula é susceptível a constante hidrólise, gerando a molécula C3i ou C3(H_2O), que tem conformação semelhante a C3b (C3b *like*) (Lachmann, 1992).

O C3(H_2O), assim como o C3b gerado pela via clássica, pode ligar-se ao BF, em uma reação dependente de magnésio, formando os respectivos complexos C3(H_2O)B e C3bB. Esses complexos sofrem a ação do fator D, que catalisa a hidrólise da ponte peptídica arginina-lisina, clivando BF em Ba e Bb. O fragmento Ba é liberado na fase fluída, enquanto Bb, enzimaticamente ativo, liga-se a C3(H_2O) ou a C3b, formando tanto a C3 convertase da fase fluída, C3(H_2O)Bb, como a de superfície celular, C3bBb. Esses complexos podem então clivar proteínas C3 adicionais, produzindo mais C3b reativo, amplificando a reação e a geração de novos complexos de C3 convertase (C3bBb) na superfície ce-

lular. Quando C3 é convertido em C3b, as pontes tioéster da molécula tornam-se instáveis e susceptíveis a ataques nucleofílicos por elétrons de grupos -OH e -NH₂, formando rapidamente ligações covalentes com proteínas e carboidratos nas superfícies ativadoras. (Abbas; Lichtman; Poher, 1997).

O complexo C3bBb, extremamente instável, é estabilizado pela properdina (fator P), podendo clivar novas moléculas de C3 (Volanakis, 1998; Proding, 1999). Se moléculas adicionais de C3b são inseridas na C3 convertase (C3bBbPC3b)_n, é gerada a C5 convertase da via alternativa, que cliva C5 em C5a e C5b, de forma semelhante à via clássica. Nessa etapa, tanto a via alternativa como a via clássica convergem para a mesma seqüência terminal de eventos, levando à formação do complexo de ataque à membrana (Fig. 1) (James, 1997).

O destino da molécula de C3b ligada a uma superfície será determinado pelo caráter ativador ou não da superfície e depende da afinidade relativa de C3 ao fator H, regulador negativo, ou ao fator B, regulador positivo da via alternativa. Nas superfícies não ativadoras tais como as membranas das células do hospedeiro, a ligação do fator H é promovida pela sua afinidade a resíduos carregados negativamente como moléculas de ácido siálico. Sua presença na porção de carboidrato das glicoproteínas permite que C3b ligado às células do hospedeiro ligue-se rapidamente ao fator H, com subsequente clivagem pelo fator I. O fator H também dissocia o complexo C3bBb que tenha se formado nas superfícies não ativadoras ou que estão presentes na fase fluída (Proding *et al.*, 1999).

3 - Via das lectinas

A via das lectinas foi descrita recentemente e tem como principal constituinte uma proteína plasmática ligante de manose (MBP), também conhecida como lectina ligante de manose (MBL) (Ikeda *et al.*, 1987; Turner, 1996). Essa pertence a família das colectinas e possui uma estrutura muito similar a da molécula de C1q, com cadeias polipeptídicas formando hélices tríplexes de colágeno, reunidas em um feixe colagenoso com extremidades globulares, semelhante a um buquê de tulipas (Sim, 1992).

A concentração plasmática da MBL varia de 1 μ g/ml a 20 μ g/ml e é determinada, geneticamente, elevando-se durante a fase aguda da resposta. Sabe-se, atualmente, que tanto diferenças quantitativas como qualitativas nas variantes alélicas da MBL influenciam a predisposição às infecções e outras doenças (Super *et al.*, 1989).

A MBL, através da porção globular terminal de cada cadeia, reconhece, na superfície de diferentes microrganismos, resíduos específicos de carboidratos, como N-acetilglucosamina ou manose. Essa reação é dependente de cálcio (Roitt; Brostoff; Male, 1996; Volanakis, 1998). Vários patógenos têm sido descritos como ligantes da MBL, tais como *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Neisseria sp.*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, entre outros (Proding, 1999).

A ligação da MBL ao alvo leva a uma alteração conformacional da mesma, que provoca a ativação de duas serina-proteases, MASP-1 e MASP-2, homólogas a C1r e C1s. A MASP-2 ao ser ativada, tal como C1s, também vai ativar C4 e C2, e levar à formação da C3 convertase da via clássica, de forma independente de

anticorpo e de C1 (Fig. 1) (Sim, 1992; Reid, 1998; Proding, 1999). Por outro lado, a MASP-1 pode clivar diretamente C3 (Walport, 2001a).

4 - Via final efetora

A ativação do complemento na superfície da membrana celular, independente da via inicial, leva a uma mesma via final efetora, com a formação do complexo C5b-9 ou MAC. O primeiro passo dessa via é a clivagem de C5, através das C5 convertases da via clássica e alternativa, com consequente formação de C5a e C5b (James, 1997; Proding, 1999).

Uma série de interações sequenciais não enzimáticas entre C5b, C6, C7, C8 e C9 resulta na formação do MAC. A molécula C5b é estabilizada ao formar um complexo hidrofílico com C6 (C5b6). A ligação de C7 a esse complexo induz a uma transição do mesmo ao estado hidrofóbico, que permite ao complexo C5b67 inserir-se, firmemente, na camada bilipídica e ligar-se à molécula de C8, que também se insere na membrana da célula alvo (Fig. 1) (Delves; Roitt, 1992; Volanakis, 1998).

O complexo C5b-8 tem ação lítica limitada, mas atua como agente polimerizante de C9. A ligação subsequente de até 12 ou 15 moléculas de C9, seguida da polimerização dessas, forma uma estrutura tubular não homogênea (poli-C9), inserida na superfície celular, à qual C5b-8 mantém-se ligado. O potencial lítico total do MAC depende de C9 produzir poros grandes suficiente para levar à lise da célula nucleada (Abbas; Lichtman; Pober, 1997; Proding, 1999).

Moléculas de perfurina também sofrem polimerização, formando canais transmembrânicos, ao serem liberadas de grânulos citoplasmáticos de linfócitos T citotóxicos e de células *natural killer* (NK). Essas proteínas apresentam grande homologia estrutural e funcional com C9 (Delves; Roitt, 1992).

Embora os poros produzidos por C5b-9 (MAC) permitam a passagem de íons potássio e cálcio para o interior da célula, estes são pequenos demais para permitir a saída de moléculas maiores como proteínas. Tal situação resulta no influxo de água para a célula, levando à lise osmótica ou ainda à morte celular devido a um acúmulo letal de altas concentrações de cálcio (Delves; Roitt, 1992; Abbas; Lichtman; Pober, 1997).

Quantidades não letais do MAC parecem estimular a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, inclusive radicais de oxigênio, prostaglandinas, leucotrienos e interleucinas. É, portanto, possível que a resposta celular específica na ausência de lise possa ser uma importante função do MAC.

Possivelmente, o papel do MAC na defesa contra microorganismos parece ser menor do que quando atua patologicamente lesando células do hospedeiro (Abbas; Lichtman; Pober, 1997).

QUADRO I
proteínas regulatórias solúveis e de membrana celular

Proteína	Interação com	Função
Proteínas solúveis:		
Inibidor de C1 (C1 INH)	C1r, C1s	Liga-se a C1r e C1s, dissociando-os de C1q e bloqueando sua participação na via clássica
C4bp (proteína ligante de C4)	C4b	Acelera a dissociação da C3 convertase da via clássica (C4b2a) Co-fator para o fator I, mediando a clivagem de C4b
Fator H	C3b	Acelera a dissociação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb). Co-fator para fator I, mediando a clivagem de C3b Compete com sítio de ligação de fator B (BF)
Fator I	C4b, C3b	Cliva e inativa C3b e C4b, usando o fator H, C4bp, MCP ou CR1 como co-fator
Carboxipeptidase N	C3a, C4a, C5a	Remove o resíduo arginina carboxi terminal e inativa as anafilatoxinas
Proteína S	C5b-7	Liga-se ao complexo C5b-7 e previne a inserção do MAC na membrana
SP-40,40	C5b-9	Modula a formação do MAC
Proteínas integrais de membrana:		
Proteína co-fatora de membrana (MCP/CD 46)	C3b, C4b	Co-fator para o fator I - media a clivagem de C3b e C4b
Fator de decaimento da aceleração (DAF)	C4b2b, C3bBb	Acelera a dissociação das C3 convertases da via clássica e alternativa
CD 59	C7, C8	Inibe a lise de células homólogas Bloqueia a ligação de C9 a C8, prevenindo a formação do MAC e lise

Nota: MAC = complexo de ataque à membrana | Fonte: Adaptado de Abbas, Lichtman e Pober (1997)

Controle da ativação do sistema complemento

Como um mecanismo potencialmente autolesivo, a ativação do complemento tem que ser evitada ou, ao menos, restringida sobre as células autólogas. Sob condições fisiológicas, a ativação descontrolada é prevenida por um vasto arsenal de proteínas regulatórias, tanto na fase fluída (plasma) como nas superfícies celulares, estando voltadas, principalmente, para os eventos centrais das três vias, que levam à ativação de C3 e à polimerização de C9 (Kirschfink, 1997; Proding *et al.*, 1999). As principais proteínas e suas funções encontram-se no Quadro I.

Conseqüências biológicas da ativação do complemento

As atividades biológicas do complemento estão envolvidas tanto com o aspecto de lise, decorrente da inserção do complexo C5b-9 à superfície celular, como com a ligação dos produtos de ativação com receptores específicos de membrana, expressos em diferentes tipos de células.

1 - Lise de membranas celulares

A lise de microrganismos, mediada pelo complemento, é um importante mecanismo de defesa contra certos tipos de infecções bacterianas e virais. Entretanto, muitos desses microrganismos já adquiriram formas de resistência à morte pelo complemento, como algumas bactérias gram positivas, fungos, protozoários e helmintos (Bing; Alper, 1995).

Ao contrário dos eritrócitos, muitas células, particularmente as nucleadas, são relativamente resistentes à lise pelo complemento homólogo, sendo que a ativação na sua superfície é freqüentemente sublítica. O ataque sublítico do complemento, além de proteger a célula do hospedeiro da citólise, estimula a neossíntese de proteínas, o metabolismo de ácido araquidônico e também ativa os leucócitos polimorfonucleares. Além de elevar transitoriamente o cálcio intracelular e ativar a proteína quinase C, tem o potencial de induzir atividade pró-coagulante e pró-inflamatória. Logo, a presença do MAC na superfície de células do sistema imunológico viáveis sugere um papel modulatório na fisiologia da célula à qual se ligou. É possível que a principal função biológica da cascata terminal do complemento, como um importante braço efetor da defesa hu-

moral do hospedeiro, vá além daquela originalmente descrita (Prodinger, 1999).

2 - Oponização e fagocitose

O favorecimento da fagocitose, através da opsonização, possivelmente, representa uma das contribuições mais importantes do complemento na defesa do hospedeiro, mediando a ligação e a ingestão de partículas estranhas, incluindo vírus, bactérias, células tumorais e complexos imunes solúveis (Bing; Alper, 1995). O componente C3 representa a fonte da principal opsonina do complemento, através das moléculas de C3b e iC3b ligadas, covalentemente, à superfície celular, mais especificamente a receptores de fagócitos como neutrófilos e monócitos/macrófagos. C3b e C4b ligam-se ao receptor CR1 e iC3b ao receptor CR3. Essas interações permitem a aderência de microrganismos aos fagócitos do hospedeiro, levando à sua ingestão e conseqüente destruição através das enzimas lisossomais (Bing; Alper, 1995; James, 1997).

As moléculas C5a e C5a des Arg também têm um papel crítico na fagocitose ao atraírem e ativarem fagócitos. As células fagocíticas estimuladas por C5a expressam maior quantidade de CR3 e CR4 (moléculas de adesão), que ligam os neutrófilos ao endotélio vascular, permitindo a aderência e migração desses para o sítio inflamatório (Ross, 1992; Prodinger, 1999).

O receptor para C1q (C1q-R), também conhecido como receptor de colectinas, está presente em monócitos, macrófagos, células B, granulócitos, células endoteliais, fibroblastos e plaquetas. Esse permite a interação não apenas com C1q, como com outros membros da família colectina, como a MBL. Desta forma, a presença de C1q-R em diferentes células favorece que estas realizem o englobamento de bactérias opsonizadas com MBL e de complexos imunes-C1q, regulando a fagocitose, induzindo a produção de radicais de oxigênio e favorecendo a citotoxicidade celular (Ross, 1992; Prodinger, 1999).

3 - Solubilização e remoção de complexos imunes

Os complexos imunes (CI) são formados constantemente na circulação e a sua concentração aumenta, significativamente, diante da resposta a estímulos antigênicos intensos. A deposição desses complexos nas paredes dos vasos, com conseqüente ativação do complemento, pode levar a reações inflamatórias altamente lesivas para os tecidos próximos (Abbas, Lichtman, Pober, 1997). As interações multivalentes da região Fab das imunoglobulinas com o antígeno e as interações não covalentes das regiões Fc de imunoglobulinas justapostas favorecem a formação de CI grandes e insolúveis. O complemento, através da via clássica, inibe a formação de CI grandes durante os estágios iniciais da reação antígeno-anticorpo, mantendo-os pequenos e solúveis. No entanto, quando se formam os complexos maiores, a via alternativa, através dos componentes B, P e C3, na presença do fator I e H, degrada-os em complexos menores e solúveis (Bing; Alper, 1995).

Os CI formados na circulação, ao ativarem o complemento, ficam opsonizados por C3b e C4b. Os eritrócitos, que possuem o receptor CR1 específico para esses fragmentos, ligam-se aos complexos (interação CR1-C3b/C4b), transportando-os até as células fagocíticas do fígado e baço, onde os mesmos são eliminados, retornando os eritrócitos à circulação (Ross, 1992). Essa

interação entre eritrócitos e CI permitiu estabelecer o papel do complemento na remoção dos CI da circulação. Enquanto os eritrócitos possuem aproximadamente 500 moléculas CR1/célula, os leucócitos têm um número superior a 50.000 CR1/célula. No entanto, mais de 85% do CR1 do sangue está nos eritrócitos, devido ao elevado número desses na circulação (Prodinger, 1999).

4 - Remoção de células apoptóticas

Outra propriedade biológica do complemento, relacionada à interação com receptores celulares, é a remoção de células apoptóticas pelos macrófagos. A ligação de C1q, proteína C reativa e IgM às células que tenham sofrido apoptose, leva à ativação do complemento na superfície das mesmas, favorecendo a interação com receptores do complemento presentes em macrófagos, com subseqüente captura e destruição das células. A eliminação de células mortas contribui com a redução da exposição de auto-antígenos ao sistema imunológico (Mevorach *et al.*, 1998; Walport, 2001b).

5 - Interface entre a imunidade inata e adaptativa

O complemento desempenha, também, um importante papel fisiológico na interação entre a imunidade inata e adaptativa. A molécula C1q, ao ligar-se às moléculas de anticorpos nos complexos imunes, ativando a via clássica, representa um dos elos dessa interação. A opsonização de microrganismos, mediada por complemento, facilita a captura e apresentação de antígenos pelas células apresentadoras, via receptor do complemento. Ainda a ativação de células B, modulada por co-receptores, especialmente CR2, favorece a interação dessa célula com antígenos e sua subseqüente ativação (Prodinger, 1999; Walport, 2001b).

6 - Efeito pró-inflamatório

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são mediadores humorais reconhecidos principalmente por suas funções pró-inflamatórias e imunoreguladoras, que atuam, efetivamente, na defesa do hospedeiro. Embora os efeitos pró-inflamatórios das anafilatoxinas sejam benéficos no contexto das infecções ou injúrias localizadas, há um número de doenças não infecciosas e síndromes, nas quais as anafilatoxinas desempenham um papel deletério (Ember; Jagels; Hugli, 1998).

Os efeitos biológicos das anafilatoxinas estão relacionados à expressão dos receptores específicos (C3a-R, C4a-R, C5a-R) em vários tipos de células, principalmente mastócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Ainda, a expressão de C5a-R é encontrada em basófilos, macrófagos, células endoteliais, células de músculo liso, células epiteliais e astrócitos. (Abbas; Lichtman; Pober, 1997; Ross, 1992).

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são pequenos peptídeos catiônicos, de estrutura muito similar, sendo C5a a mais potente dessas, seguida de C3a e C4a (Bing; Alper, 1995).

As anafilatoxinas, principalmente C3a e C5a, ao ligarem-se aos receptores de mastócitos e basófilos, causam degranulação e liberação de mediadores vasoativos, em especial histamina e leucotrienos. Esses induzem aumento na permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. C5a tem ainda múltiplos efeitos, promovendo derrame vascular e exocitose, além de estimular a expressão de p-selectina nas células do

endotélio vascular, favorecendo a adesão de fagócitos. C5a tem intensa atividade quimiotática sobre neutrófilos; induz maior expressão de proteínas de adesão, como CR3 e CR4, mediando o tráfego desses nos tecidos; além de estimular a produção de radicais de oxigênio e prostaglandinas. C3a tem atividade similar, porém menos intensa (Roitt; Brostoff; Malle, 1996; Ember; Jagels; Hugli, 1998; Proding, 1999).

A atividade das anafilatoxinas, nestas reações, é dependente da arginina-C-terminal. A molécula C5a tem meia vida curta na circulação devido a ação da enzima plasmática carboxipeptidase-N, que cliva a arginina-C-terminal da molécula de C5a, gerando C5a des Arg, que é menos ativa que C5a. De forma similar, tem-se a des Arg de C3a e C4a, com atividade biológica totalmente reduzida (Bing; Alper, 1995). Embora C5a des Arg tenha afinidade de ligação reduzida, comparando-se com C5a, essa é o maior ligante de C5a-R *in vivo*, devido à sua ligação com uma proteína sérica (co-chemotaxina) que favorece a interação com C5a-R (Ross, 1992).

O fragmento C2b, liberado pela clivagem de C2, também participa do processo inflamatório. Esse interage com a plasmina e apresenta atividade similar a cinina, levando à contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e dor (Bing; Alper, 1995; James, 1997).

Estudos experimentais mostram que os produtos de ativação de BF, os fragmentos Ba e Bb, também apresentam ação pró-inflamatória. Hamuro, Hadding e Bitter-Suermann (1978) demonstraram que a molécula Ba, embora não promova a contração da musculatura lisa e liberação de histamina por mastócitos, tem a propriedade de estimular a migração de polimorfonucleares de porquinhos da Índia. Por outro lado, segundo Götze, Bianco e Cohn (1979), o fragmento Bb, além de fazer parte da C3 convertase da via alternativa, induz alterações na função de macrófagos, *in vitro*, aumentando o espalhamento desses. Messias *et al.* (1985) demonstraram um aumento significativo de Ba em pacientes brasileiros com paracoccidiodomicose em atividade, ressaltando a participação dessas moléculas e da via alternativa na resposta imunológica do hospedeiro ao fungo, bem como na evolução da infecção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os aspectos recém colocados deixam evidentes os avanços que foram atingidos nos últimos anos no conhecimento da estrutura e imunobiologia dos diversos componentes do sistema complemento. O entendimento das interações moleculares entre as proteínas desse sistema com as estruturas de superfície dos microrganismos potencialmente ativadores de qualquer das três vias do complemento ou com os componentes celulares próprios do hospedeiro, possibilitaram gradualmente o esclarecimento das principais propriedades biológicas do sistema complemento e sua importância no equilíbrio do organismo do indivíduo.

Estudos clínicos têm destacado ainda os distúrbios genéticos do complemento em diferentes doenças humanas, propiciando maior predisposição a doenças auto-imunes e infecções, além das conseqüências deletérias decorrentes de uma ativação exarcebada. Estudos promissores e recentes vislumbram a inibição es-

pecífica da ativação do complemento como uma possível e nova estratégia terapêutica na inflamação (Kirschfink *et al.*, 1997).

REFERÊNCIAS

1. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. The complement system. In: _____. *Cellular and molecular immunology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 313-338.
2. Bing, D.H.; Alper, C.A. Complement in health and disease. In: Colvin, R.B.; Bhan, A.K.; McCluskey, R.T. *Diagnostic Immunopathology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995. p. 85-94.
3. Delves, P.J.; Roitt, I.M. Complement, post-C3 (lytic) pathway. In: Roitt, I.M.; Delves, P.J. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992. p. 385-387.
4. Ember, J.A.; Jagels, M.A.; Hugli, T.E. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: Volanakis, J.E.; Frank, M.M. *The human complement system in health and disease*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 241-284.
5. Glovsky, M.M. Applications of complement determinations in human disease. *Annals of Allergy*, Palatine, v. 72, n. 6, p. 477-790, 1994.
6. Götze, B.; Bianco, C.; Cohn, Z.A. The induction of macrophage spreading by factor B of the properdin system. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 149, n. 2, p. 372-386, 1979.
7. Hamuro, J.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D. Fragments Ba and Bb derived from guinea pig factor B of the properdin system: purification, characterization and biologic activities. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 120, n. 2, p. 438-444, 1978.
8. Ikeda K. *et al.* Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 262, n. 16, p. 7451-7454, 1987.
9. James K. Mechanisms of the nonspecific immune response. In: Sheehan, C. *Clinical Immunology. Principles and laboratory diagnosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 33-53.
10. Kirschfink, M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology*, New York, v. 38, n. 1-2, p. 51-62, 1997.
11. Lachmann, P.J. Complement, alternative pathway. In: Roitt, I.M.; Delves, P.J. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992. p. 371-372.
12. Messias, I.J.T. *et al.* Activation of complement pathways in patients with PCM. In: Brazilian Meeting Of Immunology, 1985, Guarujá. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Guarujá, 1985, v. 18, p. 612A.
13. Mevorach, D. *et al.* Complement dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 188, n. 12, p. 2313-2320, 1998.
14. Porcel, J.M.; Vergani, D. El sistema complemento: una fascinante cascata biológica. *Medicina Clínica*, Barcelona, v. 100, n. 11, p. 428-435, 1993.
15. Proding, W.H. *et al.* Complement. In: PAUL, W. *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 967-995.
16. Reid, K.B.M. C1q and mannose-binding lectin. In: Volanakis, J.E.; Frank, M.M. *The human complement system in health and disease*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 33-48.
17. Roitt, I.; Brostoff, J. Male, D. Complement. In: _____. *Immunology*. 4. ed. London: Mosby, 1996, p. 13.1-13.17.
18. ROS S, G.D. Complement receptors. In: Roitt, I.M.; Delves, P.J. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992. p. 388-391.
19. Sim, R.B. Complement, classical pathway. In: Roitt, I.M.; Delves, P.J. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992. p. 373-377.
20. Super, M. *et al.* Association of low levels of mannose-binding protein with a common defect of opsonisation. *The Lancet*, London, v. 2, n. 8674, p. 1236-1239, 1989.
21. Volanakis, J.E. Overview of the complement system. In: Volanakis, J.E.; Frank, M.M. *The human complement system in health and disease*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 9-32.
22. Walport, M.J. Complement. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 344, n.14, p. 1058-1066, 2001(a).
23. Walport, M.J. Complement. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 344, n.14, p. 1140-1144, 2001(b).

Endereço para correspondência

Profª Drª Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Laboratório de Imunopatologia

Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências da Saúde

Rua Padre Camargo, 280

CEP 80060-240

Curitiba, Paraná - Brasil

E-mail: shirley@ufpr.br