

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Prêmio CFF

- Lesão intra-epitelial cervical: existe correlação entre o tempo de realização do exame de Papanicolaou e o aspecto do colo uterino para o aparecimento da lesão? 191**
Janice Corrêa Mendes, Luiz Mário da Silva Silveira & Alcyone de Oliveira Paredes
Squamous intraepithelial lesion: do exist interval role of time between Pap test and the uterine cervix aspect in its appearance?

- Pseudoanemia dilucional e os atletas olímpicos 197**
Claudio Fernández Araujo, Maria Suzana de Moraes, Ana Paula Souza Diniz & Alexandre Elias Cosendey
Dilutional pseudoanemia and the olympic athletes

Relato de caso clínico

- A importância dos exames laboratoriais no monitoramento da doença de Graves e artrite reumatóide 201**
Edna Maria Vissoci Reiche, Nayara Delgado André, Andressa de Freitas, Egberto Munhoz & Francieli Delongui
The importance of laboratorial tests in the clinical course and therapeutic monitoring in Graves' disease and rheumatoid arthritis

- Ceratomycose causada por *Fusarium solani* no interior do Rio Grande do Sul, Brasil 207**
Patrícia Abelin Vargas, Lisiane Piltz & Sydney Hartz Alves
Keratomycosis by *Fusarium solani* in hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil

- Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram Negativos Não Fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - CE 209**
Everardo Albuquerque Menezes, Fábio Vanderlan Viana Macedo, Francisco Afrânio Cunha, Maria do Socorro de Sena Andrade & Maria Valdenir Abreu de Paula Rocha
Infection and antimicrobials profile resistance from Nonfermentative Gram Negatives Bacilli isolated in the Patological Clinic Laboratory Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia, Fortaleza, Ceará

- Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas 213**
Oliveira, T.T., Nagem, T.J., Lopes, R.M., Moraes, G.H.K., Ferreira Junior, D.B., Silva, R.R. & Maia, J.R.S.
Different doses of the flavonoid rutin on the serum lipids levels in male and female rabbits

- Mecanismo de interferência do ácido ascórbico em ensaios bioquímicos baseados no sistema oxidase/peroxidase (reação de Trinder) 217**
Flávia Martinello & Edson Luiz da Silva
Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests using peroxide and peroxidase to generate chromophore (Trinder's reaction)

- Caracterização microbiológica do leite humano processado em banco de leite de João Pessoa - PB 225**
Adalberto Coelho da Costa, Cristina Paiva Sousa & Lauro Santos Filho
Microbiologic characterization of human milk processed from milk bank in João Pessoa, Paraíba/Brazil

- Enteroparasitoses: prevalência nos alunos da Escola Estadual de Carneirinho - MG 231**
Gilmar Machado Lima & Gonçalo de Souza Cotrim
Enteric parasitics: prevalence in students of Public School from Carneirinho, MG

- Cristalúria como um método auxiliar de investigação de pacientes litíasicos: uma experiência na Região Metropolitana de Fortaleza 233**
Sônia Leite da Silva, Sílvia Fernandes Ribeiro da Silva, Rafael Bezerril Nogueira, Wanda Maria Azeredo Demoraes Campos, Alson Gurgel Fernandes & Henry de Holanda Campos
Cristalluria like method of lithiasis investigation in patients: an experience in the metropolitan region of Fortaleza

Prêmio SBAC

- Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos 237**
Telma Maria Araújo Silva, Hiroshi Aoyama, Marcela Hauri & Carmen Veríssima Ferreira
Cytotoxicity studies of okadaic acid on human lymphocytes and its mitogenic effect

- Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS 241**
Roberto Christ Vianna Santos, Jairo Luis Hoerle, Alzira Resende de Carmo Aquino & Geraldo Attilio De Carli
Enteroparasites prevalence in ambulatorial patients from Divina Providencia Hospital, Porto Alegre, RS

4

VOLUME 36

2004

Lesão intra-epitelial cervical: existe correlação entre o tempo de realização do exame de Papanicolaou e o aspecto do colo uterino para o aparecimento da lesão?*

Squamous intraepithelial lesion: do exist interval role of time between Pap test and the uterine cervix aspect in its appearance?

Janice Corrêa Mendes¹, Luiz Mário da Silva Silveira² & Alcyone de Oliveira Paredes³

RESUMO – A triagem citológica é uma importante ferramenta diagnóstica utilizada para detectar lesões cancerosas e pré-cancerosas da cérvix. Neste trabalho, foi avaliada a prevalência de alterações celulares, baseado no exame de Papanicolaou em 9.466 pacientes atendidas no Laboratório Corrêa Mendes (São Luís - MA), de março a maio de 2002. Baseado nas informações existentes na ficha de entrevista, foi avaliada a influência que o aspecto do colo uterino e o intervalo de tempo da realização do exame de Papanicolaou exerce sobre o aparecimento da lesão. Foram encontrados 296 pacientes (3,13%) com laudos de alterações citológicas em células escamosas, onde em 237 (80,06%) estavam relacionadas as atipias de lesão intra-epitelial de baixo e alto grau. A avaliação da presença da lesão em relação ao aspecto do colo e tempo de realização do exame não mostrou significância estatística ($p < 0,05$). O estudo demonstrou que o prazo de intervalo de tempo que mostrou maior porcentual de aparecimento de lesão é de até três anos, reforçando o critério de triagem para o câncer cervical em curto intervalo de tempo.

PALAVRAS-CHAVE – Câncer cervical, citopatologia, lesão intra-epitelial.

SUMMARY – Cytologic screening is an important diagnostic tool used to detect precancerous and cancerous cervix lesions. This work studied the prevalence of cervical abnormalities based in Pap test results in the Corrêa Mendes Laboratory (São Luís - MA), from March to May, 2002. To base in the promptuary from each patient, it was evaluated the role of cervix aspect and the accomplishment among the Pap test interval of time and the appearance of intraepithelial lesion. It was found 296 (3.13%) patients with squamous cytologic abnormalities, which 237 (80.06%) were related to squamous intraepithelial lesions in low and high grade. It was no association between cervix aspect and interval time with the lesion appearance, respectively. The study shows that the most prevalent interval time to its appearance was until 3 years which recommended the screening for the cervical cancer in short interval time.

KEYWORDS – Cervical cancer, cytopathology, intraepithelial lesion.

INTRODUÇÃO

A citologia cérvico-vaginal, citologia oncótica ou colpocitologia é o método mais difundido mundialmente para rastreamento de células cancerosas e pré-cancerosas¹⁵.

Introduzida na década de 40 por Papanicolaou e Traut, representou grande avanço no controle do carcinoma da cérvix uterina. Gradativamente, o método foi adquirindo adeptos, assimilado em serviços de ginecologia e, atualmente, representa importante forma de controle desse tipo de neoplasia¹⁸.

A grande aceitação e aplicabilidade do método de Papanicolaou, tanto pela população como pelos próprios profissionais ligados à saúde da mulher, tem permitido a redução da incidência e mortalidade por câncer de colo de útero. Assim, a forma mais eficaz de controlar esse tipo de tumor é diagnosticar e tratar as lesões precursoras e lesões tumorais invasoras em seus estágios iniciais, quando a cura é possível em pratica-

mente 100% dos casos⁴. Entretanto, Rivoire e colaboradores²³ alertam que não há método de rastreamento, diagnóstico ou terapêutico que tenha 100% de certeza ou sucesso.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a efetividade da detecção precoce do câncer de colo de útero por meio do exame de Papanicolaou, associada ao tratamento desse câncer em seus estágios iniciais, resulta em uma redução das taxas de incidência de câncer cervical invasor que pode chegar a 80%, quando o rastreamento apresenta boa cobertura e é realizado dentro dos padrões de qualidade¹⁰.

Uma das principais características dos países desenvolvidos é a melhora da expectativa de vida da população. Nesses países, a incidência de doenças carenciais, que alarmam a situação dos países subdesenvolvidos, é baixa. Por outro lado, favorece o crescimento natural de doenças crônico-degenerativas como neoplasias e doenças circulatórias¹⁸.

O trato genital feminino, considerando sua condi-

Recebido em 06/4/2004

Aprovado em 28/7/2004

*Prêmio CFF, XXXI CBAC, 2004, Salvador, BA

*Trabalho realizado no Lab. Corrêa Mendes (São Luís - MA)

¹Farmacêutica e Diretora Geral do Laboratório Corrêa Mendes; ²Farmacêutico-Citologista; ³Farmacêutica.

ção anatômica, apresenta variações fisiológicas definidas desde o período fetal até a senilidade. Encontra-se em contato direto com o meio exterior, devido a sua localização topográfica, sendo exposto às várias agressões inflamatórias, infecciosas ou não. As reações tissulares permanecem, na maioria das vezes, restritas ao local de origem, podendo, contudo, propagarem-se adquirindo um caráter sistêmico¹⁶.

Estudos experimentais, epidemiológicos e moleculares sustentam a teoria de que a carcinogênese da cérvix uterina é um processo complexo, de múltiplos estágios, que conduz uma célula normal ao desenvolvimento neoplásico. É um processo evolutivo, começando com alterações relativamente discretas no epitélio pavimentoso da endocérvix, progredindo com o avanço da lesão até a invasão do estroma. Essa evolução ocorre, via de regra, em 10 a 15 anos, embora possa ser mais rápida¹⁶.

Clinicamente, o tumor apresenta-se sob duas formas: papilar (exfoliativa) e infiltrante (endofítica). Inicialmente invade o colo, estendendo-se à vagina, aos órgãos vizinhos e aos paramétricos, inclusive os linfonodos, antes de se generalizar⁹.

O câncer é uma doença celular somática que se desenvolve como resultado de uma predisposição genética ou através da exposição ambiental. Longatto Filho e Silva Filho afirmam que não existe um único agente cancerígeno na etiologia do carcinoma da cérvix. Inúmeros agentes causais têm sido referidos, sendo os mais importantes os vírus oncogênicos, carcinógenos químicos e radiações ionizantes¹⁶.

A literatura documenta que há um papel primordial dos agentes carcinogênicos sobre os tecidos susceptíveis da cérvix, favorecida por uma série de fatores predisponentes. Os fatores de risco inerentes para as lesões precursoras e o câncer cervical são na maioria das vezes relacionados à atividade sexual. Esses fatores incluem: relação sexual precoce, multiparidade, condições socioeconômicas, higiene pessoal, agentes infecciosos, processos inflamatórios de diversas etiologias, espermatozoides, deficiências nutricionais, hormônios, agentes imunossupressores, fatores genéticos, uso prolongado de contraceptivos orais, tabagismo, etc.¹⁶.

Dentre os agentes infecciosos, destaca-se a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), acreditando-se ser esta a infecção viral mais freqüentemente transmitida por via sexual, originando também uma das mais prevalentes entre todas a doenças sexualmente transmissíveis¹⁹.

A importância que assume hoje em nível mundial o estudo do HPV vem de sua nítida correlação com os processos malignos e lesões precursoras da cérvix uterina, sendo considerado o maior fator de risco para a gênese do processo maligno¹⁷.

No final da década de 90, o câncer invasivo de colo uterino era a segunda neoplasia mais comum entre as mulheres, sendo superada apenas pelo câncer de mama¹⁷. Segundo estimativas recentes, o câncer de colo de útero é o terceiro tipo de câncer mais comum na população feminina, sendo superado pelo câncer de pele não melanoma e pelo de mama⁵. Tem sido estabelecido que o câncer de colo uterino, em cerca de 40% dos casos, evolui a partir de lesões intraepiteliais de células escamosas (SIL), muito embora nem toda lesão precursora progrida para um processo invasor⁴.

A classificação das lesões intraepiteliais foi origi-

nalmente baseada na designação de classe numérica de Papanicolaou e, desde então, tem sofrido diversas modificações no sentido de melhor informar as alterações celulares em nível cervical¹². Dentre as classificações que se seguiram, as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) são as de uso mais difundido, introduzidas por Richart em 1967²¹. No entanto, a não uniformização de terminologias era um problema entre os pesquisadores, o que culminou com o surgimento, em 1988, de uma nova classificação, chamada de sistema Bethesda, que nomeia as lesões precursoras em lesões intraepiteliais de células escamosas (SIL), subdividindo-as em lesões de baixo e alto grau, LSIL e HSIL, respectivamente^{12,28,29,31}.

O diagnóstico do sistema Bethesda, semelhante ao da OMS, é baseado na maioria das células anormais presentes, sem levar em consideração a quantidade das mesmas. Além disso, observa-se que o local de origem de uma anormalidade numa amostra citológica cervico-vaginal não pode ser determinado porque tumores morfológicamente idênticos podem surgir na vagina, cérvix, endométrio ou ovário. As alterações morfológicas anormais descritas nesse sistema incluem duas categorias bem problemáticas: atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) e atipias de células glandulares de significado indeterminado (AGUS)²⁷. O diagnóstico destas atipias permanece um enigma para o tratamento, uma vez que pode compreender alterações benignas, reativas ou pré-neoplásicas².

Quanto ainda à nomenclatura, o diagnóstico de carcinoma permanece o mesmo, a despeito de qualquer classificação utilizada. Projeções dão conta que são detectados cerca de 371.000 novos casos de câncer cervical invasivo por ano no mundo todo, representando 10% de todos os tipos de câncer em mulheres⁸. No Brasil, o câncer de colo uterino continua a ser um sério problema de saúde pública. De todas as mortes por câncer na faixa etária entre 35 a 49 anos, em 1998, 16% foram devidas ao câncer de colo de útero. Além disso, a análise dos coeficientes específicos de mortalidade mostrou uma elevação de 29% em 20 anos, passando de 3,44 em 1979 a 4,45 por 100.000 mulheres em 1998. Foi observado ainda que existe uma grande variabilidade nas taxas de incidência no país, sendo as maiores estimadas para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste⁴.

Uma das principais razões que evidenciam esse panorama no Brasil resulta do fato de que durante muitos anos a realização do preventivo ginecológico ocorreu fora do contexto de um programa estruturado que estimulasse a procura regular e garantisse o acesso ao exame preventivo das mulheres mais vulneráveis à doença, assim como o tratamento dos casos positivos⁴.

A maior freqüência de casos de neoplasia determina maiores gastos relacionados a diagnóstico e, sobretudo, tratamento. Dessa forma, houve a necessidade da elaboração e estímulo de programas de educação e rastreamento na população, principalmente de risco, determinando o diagnóstico de lesões precursoras ou pré-malignas, racionalizando o emprego dos recursos econômicos, materiais e pessoais¹⁸.

O exame citopatológico (Papanicolaou), por ser um exame simples, barato, seguro e aceitável pela população feminina associado às características biológicas do câncer de colo de útero, resulta num elevado potencial

de prevenção e cura, o que não era aplicado de forma eficiente no país, de modo a permitir mudanças no perfil epidemiológico da doença. Apenas a inserção do exame preventivo ginecológico nas rotinas de saúde não era suficiente para causar impacto no perfil da incidência e mortalidade pela doença. Assim, tornou-se imprescindível organizar e articular ações em todo o território nacional para motivar as mulheres mais vulneráveis à doença e preparar uma rede quantitativa e qualitativamente capacitada para a realização do exame, oferecendo um encaminhamento adequado àquelas com positividade nos seus exames⁴.

Baseando-se nisso, o Ministério da Saúde (MS), por meio do Instituto Nacional do Câncer (INCA), seu órgão técnico e coordenador das ações nacionais de prevenção e controle do câncer, e em conjunto com as secretarias estaduais e municipais de saúde, desenvolve, desde 1998, o Programa Nacional de Controle do Câncer de Colo Uterino. Esse programa estabelece as normas e recomendações básicas de prevenção, detecção, diagnóstico e tratamento do câncer de colo uterino para todo o Brasil⁴.

O programa em sua fase de intensificação permitiu a sua expansão nacional, sob coordenação da Secretaria de Políticas de Saúde, onde novas estratégias foram corrigidas ou redirecionadas anteriormente implementadas, resultando na estruturação da rede assistencial, garantindo a ampliação e qualificação da rede laboratorial para o exame citopatológico, bem como dos profissionais envolvidos. Além disso, para que a fase de intensificação tomasse conta do país, era necessária a utilização dos meios de comunicação no intuito de sensibilizar homens e mulheres em torno da questão⁴.

Nesse contexto, e visando avaliar a situação de alterações celulares cérvico-vaginais e sua correlação com o tempo de realização do exame e o aspecto do colo uterino, realizou-se levantamento de fichas de pacientes submetidas a colpocitologia oncológica através da análise dos laudos citológicos das pacientes, emitidos pelo Laboratório Corrêa Mendes (São Luís-MA).

METODOLOGIA

• População alvo

A população alvo estudada constituiu-se de 9.466 pacientes residentes em municípios da Regional Itapecuru, localizados no Cerrado Maranhense, que participaram da II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, cuja coleta de material aconteceu no período de março a maio de 2002.

• Processamento das amostras

Os esfregaços cérvico-vaginais foram colhidos e fixados nos postos de coleta de origem e encaminhados ao Laboratório Corrêa Mendes. Para fins diagnósticos, após a devida identificação do material, este foi submetida à coloração de Papanicolaou e montado com Entellan[®]. A leitura dos esfregaços foi feita por um profissional e, em casos positivos, estes eram observados por mais dois profissionais.

• Coleta de dados

As informações acerca de alterações celulares foram obtidas após a leitura dos esfregaços, estando registradas em fichas padronizadas pelo MS. Nessas fichas,

contendo dados de identificação pessoal, clínicos e epidemiológicos, o diagnóstico citológico era baseado nas classificações modificadas de Richart e Bethesda.

• Nomenclatura utilizada

Neste trabalho foi utilizada a nomenclatura proposta pelo sistema Bethesda¹⁴. A adoção deste sistema único de nomenclatura citológica foi utilizada por permitir a uniformidade no relato e interpretação dos resultados.

• Análise de dados

Os dados obtidos foram registrados em tabelas e gráficos e analisados em Programa Excel for Windows[®], utilizando-se o teste qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates, e significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame de Papanicolaou é um teste citológico utilizado para detectar células cervicais anormais. *Screening* periódicos e avaliação de seguimento em mulheres com idade acima de 30 anos são formas aceitáveis e de baixo custo para a prevenção de câncer cervical. No entanto, deve-se assumir que esta metodologia seja acurada e que a cobertura da população atinja níveis elevados.

Baseado em dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), Roberto Netto²² assegura que a partir de 2020 serão diagnosticados cerca de 15 milhões de novos casos de câncer por ano, sendo que 70% deles ocorrerão em países com poucos recursos para controle da doença.

No Brasil, a partir de 1998, um programa nacional visando a cobertura de toda população feminina brasileira foi instituído, dada a crítica situação que ocupa a mortalidade por câncer cervical no país. O Laboratório Corrêa Mendes, integrante da rede laboratorial conveniada ao Sistema Único de Saúde (SUS), está qualificado junto à Coordenação Estadual do Programa Viva Mulher (Gerência de Qualidade de Vida) para atender pacientes oriundos dos municípios da Regional Itapecuru, sendo que durante a II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino foram realizados 9.466 exames de Papanicolaou dessa Regional, havendo participação de todos os seus municípios integrantes.

Localizada no Cerrado Maranhense, os municípios da Regional Itapecuru apresentam um contingente populacional aproximado de 254.133 habitantes, o que corresponde a 4,5% da população estadual, não se observando uma diferença na densidade populacional entre eles, à exceção do município Itapecuru Mirim, o mais populoso deles¹¹.

Segundo dados do IBGE, existem nesta regional cerca de 125.886 mulheres, estando aí incluídas todas as faixas etárias. A campanha nacional deu ênfase especial à faixa entre 35-49 anos, muito embora não houvesse limitação para atendimento a outras faixas etárias. Neste aspecto, foi constatado que das 9.466 pacientes atendidas no Laboratório Corrêa Mendes, 3.754 (39,66%) destas tinham idade inferior a 35 anos, 4.054 (42,83%) entre 35-49 anos e 1.658 (17,51%) apresentavam idade superior a 49 anos (Tab. I). Analisando-se a correlação existente entre as três faixas etárias, observou-se não existir relação entre elas. No entanto, foi

TABELA I
Distribuição de casos diagnosticados por faixa etária.
(II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002)

Faixa etária (anos)	n	%
< 35	3.754	39,66
35-49	4.054	42,83
> 49	1.658	17,51
Total	9.466	100,00

TABELA II
Distribuição de casos diagnosticados de acordo com a inspeção do colo e o resultado citológico
(II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002)

Inspeção do colo	Sem atipias		Com atipias		Total	
	n	%	n	%	n	%
Normal	5.848	61,78	173	1,83	6.021	63,61
Alterado	2.174	22,97	107	1,13	2.281	24,10
Não mencionado	1.148	12,12	16	0,17	1.164	12,29
Total	9.170	96,87	296	3,13	9.466	100,00

observada estreita relação no número de pacientes atendidas nas duas primeiras faixas.

Dos 9.466 exames realizados pelo Laboratório Corrêa Mendes, 296 (3,13%) (Fig. 1) apresentaram alterações celulares evidentes no exame preventivo. Em uma análise preliminar, a taxa encontrada neste trabalho concorda com as projeções propostas pelo INCA para esta segunda campanha, estabelecido em 2,70%, estando aí relacionadas as várias atipias celulares observadas no esfregaço cérvico-vaginal. Silva e colaboradores²⁶ relataram a frequência de 3,10% de alterações celulares em 3.162 pacientes atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (Lacen-MA) durante a primeira Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, em 1998.

Segundo Kurman e Solomon²⁸, o número total de casos alterados diagnosticados deve corresponder a 4 a 6% do total de casos avaliados. Entretanto, Cardin⁷ relata valores entre 3 e 5%. Dados recentes revelaram taxas de resultados alterados na ordem de 4,80%²⁰, 3,14%¹ e 4,75%². O quantitativo de casos alterados diagnosticados e relatados neste trabalho (3,13%) encontram-se dentro da faixa do padrão internacional.

De acordo com a Fig. 2, as lesões de células escamosas de baixo e alto grau (LSIL e HSIL) somaram

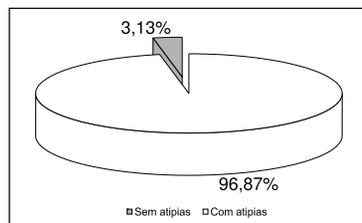


FIG. 1 - Distribuição percentual do número de exames com e sem alterações celulares. (II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002.)

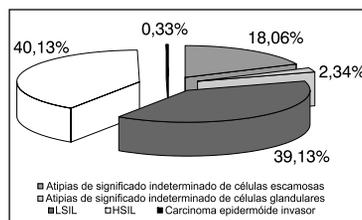


FIG. 2 - Distribuição percentual do número de exames com alterações celulares. (II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002.)

79,26% dentre todas as atipias encontradas. Em relação a todos os casos realizados, estas alterações totalizaram 2,50%, que concordam com taxas encontradas por Kjaer¹³, Sherman *et al.*²⁵ e Arcuri *et al.*² Dentre todos os casos de atipias diagnosticados, foi encontrado apenas um caso de carcinoma invasor (0,33%).

Um parâmetro informativo importante existente na ficha padrão do MS refere-se ao aspecto do colo que é visualizado no momento da coleta. Essa informação, se bem processada, pode mostrar uma correlação entre esse parâmetro e a presença de atipias no esfregaço cérvico-vaginal. Com relação à obtenção dessa informação, 87,71% (Tab. II) das fichas oriundas dos municípios da Regional Itapecuru estavam devidamente preenchidas, o que se considera um número elevado comparando-se com os dados relatados por Silva *et al.* (2002), que encontraram a taxa de 60,06% acerca de informações do aspecto do colo uterino. Estes autores reforçam a idéia de que a observação e relato da forma, dimensões, eventuais lacerações, características dos fórnices vaginais e quaisquer outras alterações podem contribuir sobremaneira com o diagnóstico citológico. Os dados relatados na Tab. II mostram que 63,61% das fichas continham informação de colo "normal", enquanto 24,10% apresentavam alguma alteração perceptível ao responsável pela coleta. Esta observação apresenta um aspecto importante, pois foi elevado o número de esfregaços com atipias celulares em colo descrito como "normal", em relação aqueles que apresentaram alguma alteração e estavam associados a atipias celulares. Uma preocupação que deve ser permanente na equipe de saúde é a qualidade da coleta do material cérvico-vaginal e, para tanto, os profissionais envolvidos neste processo devem se manter constantemente em treinamento, tanto para a descrição das informações pertinentes quanto na devida coleta e fixação do material.

Avaliando-se os casos que foram registrados na ficha como colo alterado (2.281), verificou-se que 107 (4,69%) casos estavam relacionados com atipias celulares diagnosticados. Através destes dados, e utilizando-se o modelo estatístico, verificou-se não existir relação entre a informação prestada quanto ao aspecto do colo e a presença ou ausência de atipias, ou seja, não se encontrou uma relação direta entre atipias e colo alterado.

Conforme os dados listados nas Tabs. III, IV e V, verificou-se que as maiores taxas de SIL foram encontradas na faixa de 35-49 anos (51,48%), o que se tem confirmado na literatura, a exceção do relatado por Motta e colaboradores¹⁸, que mais frequentemente encontraram alterações em mulheres acima de 60 anos. Contudo, a maior prevalência na faixa etária 35-49 anos corrobora a preocupação do INCA durante a segunda campanha, que priorizou o atendimento nessa faixa etária⁴. No entanto, há de se considerar a ocorrência de 77 (32,49%) casos de SIL entre as pacientes com idade abaixo de 35 anos, sendo que 26 pacientes foram diagnosticadas tendo HSIL. Caprara e colaboradores⁶ destacam que a prevalência do diagnóstico de LSIL diminui progressivamente com a idade, enquanto as alterações HSIL são ligeiramente maiores na faixa de 30 a 39 anos, o que também foi observado neste trabalho.

Sabe-se que o câncer de colo de útero inicia-se a

TABELA III

Relação entre as lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau por faixa etária e de acordo com o aspecto do colo, quando a paciente estava fazendo o exame pela 1ª vez (II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002)

Aspecto do colo	Faixa etária (anos)	LSIL		HSIL		Total	
		N	%	n	%	n	%
Normal	<35	16	19,51	5	6,10	21	25,61
	35-49	7	8,54	14	17,07	21	25,61
	>49	1	1,22	7	8,54	8	9,76
Alterado	<35	7	8,54	5	6,10	12	14,63
	35-49	8	9,76	6	7,32	14	17,07
	>49	2	2,44	-	-	2	2,44
Não mencionado	<35	1	1,22	1	1,22	2	2,44
	35-49	-	-	1	1,22	1	1,22
	>49	-	-	1	1,22	1	1,22
Total		42	51,22	40	48,78	82	100,00

TABELA V

Relação entre as lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau por faixa etária e de acordo com o aspecto do colo, quando a paciente estava fazendo o exame num período acima de 3 anos (II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002)

Aspecto do colo	Faixa etária (anos)	LSIL		HSIL		Total	
		N	%	n	%	n	%
Normal	<35	6	13,33	1	2,22	7	15,56
	35-49	8	17,78	7	15,56	15	33,33
	>49	1	2,22	5	11,11	6	13,33
Alterado	<35	1	2,22	-	-	1	2,22
	35-49	3	6,67	9	20,00	12	26,67
	>49	1	2,22	1	2,22	2	4,44
Não mencionado	<35	1	2,22	-	-	1	2,22
	35-49	1	2,22	-	-	1	2,22
	>49	-	-	-	-	-	-
Total		22	48,89	23	51,11	45	100,00

partir de lesão precursora, que normalmente progride lentamente, por anos, até atingir o estágio invasor. Assim, é importante a análise da periodicidade do exame de Papanicolaou, visto haver diversidade quanto à recomendação do tempo de realização do exame. Correlacionando-se os dados em função do aspecto do colo informado na ficha e o tempo de realização do exame, as maiores porcentagens de SIL foram encontradas com realização do exame até 3 anos, 46,41%, LSIL e HSIL, respectivamente. No entanto, há de se registrar que cerca de um terço das pacientes SIL foram diagnosticadas na primeira vez de realização do exame. Avaliando-se os resultados obtidos quanto à prevalência em função do tempo de realização do exa-

TABELA IV

Relação entre as lesões intraepiteliais de baixo e alto grau por faixa etária e de acordo com o aspecto do colo, quando a paciente estava fazendo o exame num período até 3 anos (II Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, Laboratório Corrêa Mendes-MA, 2002)

Aspecto do colo	Faixa etária (anos)	LSIL		HSIL		Total	
		N	%	n	%	n	%
Normal	<35	13	11,82	7	6,36	20	18,18
	35-49	18	16,36	10	9,09	28	25,45
	>49	3	2,73	9	8,18	12	10,91
Alterado	<35	5	4,55	7	6,36	12	10,91
	35-49	9	8,18	17	15,45	26	23,64
	>49	1	0,91	5	4,55	6	5,45
Não mencionado	<35	1	0,91	-	-	1	0,91
	35-49	2	1,82	2	1,82	4	3,64
	>49	1	0,91	-	-	1	0,91
Total		53	48,18	57	51,82	110	100,00

me e SIL de baixo e alto grau, não se observou diferença significativa entre as lesões e o tempo de realização do mesmo.

Dados da OMS têm demonstrado que, nas mulheres entre 35 e 64 anos, depois de um exame colpocitológico negativo, um exame subsequente pode ser realizado a cada 3 anos, com a mesma eficácia da realização anual⁴.

De acordo com os dados da Tab. V, 9,28 e 9,70%, respectivamente LSIL e HSIL, foram diagnosticados após três anos da realização do exame. Apesar da periodicidade trienal recomendada pelo MS, os valores mostrados neste trabalho não podem ser desprezados, visto que quase metade das pacientes detectadas com SIL estava fazendo o exame até três anos da realização do último.

Existe consenso que a detecção precoce de lesão cervical fornece uma oportunidade de prevenir ou interromper a progressão para um câncer invasor e, baseado nessa premissa, pesquisadores têm recomendado a realização do exame a curtos período de tempo³⁰.

Estudos têm encontrado que o risco para o desenvolvimento de câncer cervical é 3-10 vezes maior em mulheres que nunca foram examinadas. O risco também aumenta quando existe um longo lapso de tempo entre os testes. Além do mais, a sobrevivência do câncer cervical parece estar diretamente relacionada ao estágio em que a doença é detectada.

Os trabalhos de Sawaya e colaboradores²⁴ parecem reforçar a idéia da segurança da realização do exame de Papanicolaou a cada três anos, visto que um estudo envolvendo 128.805 pacientes, não foi comum o achado citológico de HSIL ou câncer cervical naquelas pacientes com até três anos de intervalo com laudo anterior negativo. No entanto, baseado nos resultados relatados, deve-se insistir na triagem anual das pacientes, a fim de que se possa oferecer às mesmas oportunidade de detecção precoce e oportunizar tratamento imediato.

CONCLUSÃO

Já está bem estabelecido na literatura e na prática clínica que o melhor e mais prático método para a detecção precoce de lesões pré-cancerosas e cancerosas da cérvix é o emprego do exame de Papanicolaou. Os programas de rastreamento, em qualquer parte do mundo, cumprem o papel de reduzir a incidência de mortalidade por câncer de colo de útero, visto que o tratamento das lesões pré-malignas conduz a praticamente 100% de cura. Na população estudada neste trabalho, a prevalência de atipias celulares ficou dentro da faixa internacional, com maior distribuição na faixa etária de 35-49 anos, não se observando diferença significativa ou uma correlação lesão / tempo de realização do exame ou lesão / aspecto do colo do útero. No entanto, tendo-se em mente que a paciente não é somente um número estatístico e sim um indivíduo que precisa ser rastreada e tratada, os órgãos governamentais devem estar dotados de recursos e infra-estrutura para a prevenção da doença, no sentido de se reduzir os casos de câncer e, por conseguinte morte por uma nosologia que pode ser detectada cedo e tratada com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do corpo de saúde dos municípios da Regional Itaipuru e aos técnicos do Laboratório Corrêa Mendes.

REFERÊNCIAS

1. Altaf, F.J. Pattern of cervical smear cytology in the western region of Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 21(1-2): 94-96, 2001.
2. Anton, R.C.; Ramzy, I.; Schwartz, M.R. *et al.* Should the cytologic diagnosis of "atypical squamous cells of undetermined significance" be qualified? An assessment including comparison between conventional and liquid-based technologies. *Cancer*, 93(2): 93-99, 2001.
3. Arcuri, R.A.; Cunha, K.C.F.; Alves, E.C. *et al.* Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(2): 141-147, 2002.
4. Brasil. Ministério da Saúde. INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2002. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2002.html>> Acesso em: 26 set.2002.
5. Cancer of the cervix. Disponível em: <<http://www.gynecancer.com/cervix.html>> Acesso em: 22 ago.2002.
6. Caprara, L.; Monari, F.; De Bianchi, P.S. *et al.* ASCUS in screening. *Pathologica*, 93(6): 645-650, 2001.
7. Cardin, V. Replies to questions on quality assurance measures in cytopathology. *Acta Cytologica*, 32(6): 1988.
8. Franco, E.L.; Duarte-Franco, E.; Ferenczy, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 164(7): 1017-1025, 2001.
9. Gompel, C.; Koss, L. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. São Paulo: Manole, 1997.
10. Gustafsson, L.; Pontén, Z.M.; Adami, H.O. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control*, 8(5): 755-763, 1997.
11. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/Estimativas_Projecoes_Mortalidade_Populacao/Inca/cancer/utero> Acesso em: 05 out. 2002.
12. Kanar, S.G. Management of abnormal Papanicolaou smears: a review. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, 5(2): 95-100, 1998.
13. Kjaer, S.K. Risk factors for cervical neoplasia in Denmark. *APMIS Suppl.*, 80: 1-41, 1998.
14. Kurman, R.J.; Solomon, D. *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy*. New York: Springer-Verlag Inc., 1994.
15. Lapin, G.A.; Derchain, S.F.M.; Tambascia, J. Comparação entre a colpocitologia oncológica de encaminhamento e da gravidade de lesões cervicais intraepiteliais. *Revista de Saúde Pública*, 34(2): 120-125, 2000.
16. Longatto Filho, A.; Silva Filho, A.M. *Colo uterino e vagina. Processos inflamatórios. Aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
17. Martins, F.M.; Parelada, C.I.; Fonseca, A.M. Câncer do colo uterino e terapia de reposição hormonal. Disponível em: <<http://www.usp.br/fm/departamento/g/gineco/publica.htm>> Acesso em: 26 set.2002.
18. Motta, E.V.; Fonseca, A.M.; Bagnoli, V.R. *et al.* Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 47(4): 302-310, 2001.
19. Noronha, V.; Melo, W.; Villa, L. *et al.* Papilomavírus humano associado a lesões da cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(3): 235-240, 1999.
20. Nyirjesy, I.; Billingsley, F.S.; Forman, M. Evaluation of atypical and low grade cervical cytology in private practice. *Obstetrics and Gynecology*, 92(4): 601-607, 1998.
21. Pizarro, A.; Larios, G.; Diaz, R. Sensitivity and specificity of colposcopy test with Bethesda classification on cervical lesions. In: *7th International Internet World Congress for Biomedical Sciences*, 2002.
22. Roberto Netto, A. Avaliação crítica do programa nacional de combate ao câncer do colo uterino do Ministério da Saúde do Brasil. São Paulo. Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia - Universidade Federal de São Paulo. 2001.
23. Rivoire, W.A.; Capp, E.; Corleta *et al.* Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47(2): 179-184, 2001.
24. Sawaya, G.F.; Kerlikowske, K.; Lee, N.C. *et al.* Frequency of cervical smear abnormalities within 3 years of normal cytology. *Obstetrics and Gynecology*, 96(2): 219-223, 2000.
25. Sherman, M.E.; Schiffman, M.; Herrero, R. *et al.* Performance of a semiautomated Papanicolaou smear screening system: results of a population-based study conducted in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer*, 84(5): 273-80, 1998.
26. Silva, H.A.; Silveira, L.M.S.; Corrêa, P.B.F. *et al.* A influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colpocitológico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 34(3): 131-135, 2002.
27. Smith-McCune, K.; Mancuso, V.; Contant, T. *et al.* Management of women with atypical Papanicolaou tests of undetermined significance by board-certified gynecologists: discrepancies with published guidelines. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(3): 551-556, 2001.
28. Solomon, D.; Davey, D.; Kurman, R. *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287(16): 2114-2119, 2002.
29. Stoler, M.H. New Bethesda terminology and evidence-based management guidelines for cervical cytology findings. *JAMA*, 287(16): 2140-2141, 2002.
30. Viikki, M.; Pukkala, E.; Hakanma, M. Risk of cervical cancer after a negative Pap smear. *Journal of Medical Screening*, 6(2): 103-107, 1999.
31. Wright, T.C.; Cox, J.T.; Massad, L.S. *et al.* 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*, 287(16): 2120-2129, 2002.

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

Pseudoanemia dilucional e os atletas olímpicos

Dilutional pseudoanemia and the Olympic athletes

Claudio Fernández Araujo¹, Maria Suzana de Moraes², Ana Paula Souza Diniz² & Alexandre Elias Cosendey¹

RESUMO – Muitos estudos descrevem os valores baixos nas concentrações de hemoglobina encontrados nos atletas como uma falsa anemia (pseudoanemia dilucional) devido a um aumento no volume plasmático como forma de adaptação benéfica do organismo destes atletas ao treinamento aeróbio. Tal fenômeno é descrito como anemia do esportista. O objetivo deste estudo foi verificar as características hematológicas e bioquímicas e analisar os componentes sanguíneos que interferem no transporte de gases e seus principais constituintes. Outras dosagens complementares foram realizadas para eliminar possíveis interferências que pudessem gerar resultados falsamente alterados, e para isso foi utilizada a Monitoração Bioquímico-Hematológica do Condicionamento Físico[®]. Para a realização deste estudo foram coletadas amostras do sangue de atletas pertencentes ao Comitê Olímpico Brasileiro das equipes de judô, atletismo, nado sincronizado, *squash*, ciclismo, vôlei e remo. Os resultados encontrados neste estudo estão compatíveis com outros trabalhos realizados com atletas estrangeiros. Foram detectados valores sanguíneos nos limites inferiores dos valores considerados normais em praticamente todas as análises efetuadas, principalmente, entre as mulheres. A detecção precoce das carências e suas devidas correções favorecem o desenvolvimento aeróbio e, conseqüentemente, um ganho de performance pelos atletas.

PALAVRAS-CHAVE – Atletas, anemia, oxigenação do organismo, treinamento físico.

SUMMARY – Many studies describe the low values in the hemoglobin concentrations found in the athletes as a false anemia (dilutional pseudoanemia) due to an increase in the plasmatic volume as to benefit the organism adaption of these athletes to the aerobic training. Such phenomenon is described as the sportsman's anemia. This study appraises the hematological characteristics, biochemistries and analyze the sanguine components and how its interfere in the gas transport and their main ones constituent. Other complementary dosages were performed to eliminate possible interferences to produce altered false results so for that the Biochemical-Hematological Monitoring of the Physical Conditioning[®] was used. For the accomplishment of this study, blood samples from athletes belonging to the Brazilian Olympic Committee teams were collected – judo, athletics, synchronized swimming, squash, cyclism, volleyball and oar. The results found in this study are compatible with other from foreign athletes. Sanguine values were detected below the values limits of the considered normal in practically all analysis, mainly among the women. The precocious detection of the lacks and its corrections helps the aerobic development to get best performance by the athletes.

KEYWORDS – Athletes, anemia, organic oxygenation, physical training.

INTRODUÇÃO

A anemia do esportista (pseudoanemia dilucional) é uma forma de anemia associada aos treinamentos de resistência e na verdade não é uma anemia propriamente dita¹⁰. O que se observa nestes atletas é que o seu volume sanguíneo tende a aumentar, mas não o número de hemácias, o que acaba sendo erroneamente interpretado como anemia, pois os teores de ferro das hemácias estão normais.

Porém, outros fatores concorrem para o desenvolvimento de uma anemia, como p.ex. falta de ferro, seus fatores de absorção e hemólise por impacto, dentre outros⁴.

O sangue apresenta como constituinte principal em sua composição os glóbulos vermelhos (hemácias) responsáveis pela oxigenação dos tecidos, que contém como principal componente em sua estrutura de formação a hemoglobina (pigmento respiratório), encarregado do transporte dos gases oxigênio do pulmão aos tecidos e dióxido de carbono em sentido inverso^{17,23,27}. Cada molécula de hemoglobina é composta de quatro grupos heme (parte corada da molécula, responsável pela cor vermelha do sangue) contendo um átomo de

íon ferroso (Fe²⁺) cada. As hemácias são responsáveis pela oxigenação de todo o organismo e por isso a importância de se detectar a deficiência de hemoglobina e seus constituintes para se diagnosticar casos de anemia em desenvolvimento.

A anemia caracteriza-se por uma diminuição do número de hemácias ou do teor de hemoglobina nas hemácias no sangue circulante, ou ambos os fenômenos associados^{24,29}.

Num quadro de anemia o coração precisa aumentar o ritmo para oxigenar os tecidos do corpo, porque contém menos hemoglobina para transportar oxigênio, ou ainda para transportar o mesmo teor de oxigênio rarefeito em grandes altitudes¹⁶. Sendo que, neste último caso, o aumento da frequência cardíaca será ainda maior em indivíduos com hemoglobina baixa.

Neste estudo foram avaliados atletas de diversas equipes do Comitê Olímpico Brasileiro (C.O.B.), e analisados os componentes sanguíneos que interferem no transporte de gases e seus principais constituintes. Outras dosagens complementares foram realizadas para eliminar possíveis interferências que pudessem gerar resultados falsamente alterados, e para isso foi utiliza-

Recebido em 21/1/2004
Aprovado em 29/1/2004

¹Laboratório de Bioquímica do Esporte. ²Laboratório de Bioquímica do Núcleo Instituto de Ciências da Atividade Física

da a Monitoração Bioquímico-Hematológica do Condicionamento Físico, proposta de Cosendey, 1997⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 65 atletas do Comitê Olímpico Brasileiro atendidos no laboratório de bioquímica do Núcleo do Instituto de Ciências da Atividade Física da Aeronáutica no período de janeiro a junho de 1999 (Tab. I).

Foram realizadas várias análises bioquímicas e hematológicas, das quais destacamos para este estudo, a contagem de hemácias, dosagem do seu conteúdo de hemoglobina, medida do volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e a determinação do hematócrito, além das dosagens de ferro e bilirrubina total séricas.

A coleta sanguínea foi realizada utilizando-se tubos, tipo vacutainer hemogard, sem anticoagulante crosco-pia, num microscópio binocular Lapophot 2 (Nikon).

Cada atleta respondeu a um questionário para a obtenção de dados considerados importantes para a interpretação dos resultados, tais como: idade, peso, altura, local de moradia e treino, uso de bebidas alcoólicas, uso de suplementos e/ou vitaminas, hábitos alimentares e anamnese patológica. Todos os atletas assinaram um termo de consentimento de pesquisa, bem como a autorização da divulgação dos resultados para fins científicos.

TABELA I
Características da população analisada

Equipe	Nº de indivíduos	Sexo	
		Masculino	Feminino
Judô	13	7	6
Atletismo	16	9	7
Nado Sincronizado	6	0	6
Squash	4	3	1
Ciclismo	6	6	0
Vôlei	5	5	0
Remo	14	11	3
Total	65	42	23

TABELA II
Valores esperados das análises hematológicas e bioquímicas realizadas

Análise	Metodologia empregada pelo aparelho	Valores normais	
		Homens	Mulheres
Hematimetria (Hm)	Contagem eletrônica	4,5 a 6,5 x10 ⁹ /mm ³	3,8 a 5,8 x10 ⁹ /mm ³
Hemoglobina (Hb)	Colorimetria pela cianometahemoglobina	13 a 19g/dl	12,5 a 16,5g/dl
Hematócrito (Hct)	Soma dos VCMs da hematimetria	40 a 54%	38 a 47%
Volume Corpuscular Médio (VCM)	Medida por bioimpedância	82 a 92µ ³	
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	Cálculo baseado na Hb e na Hm	27 a 32pg	
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	Cálculo baseado na Hb e no Hct	32 a 36g/dl	
Bilirrubina total (Bt)	Jendrassik/Grof	0,2-1,0mg/dl	
Ferro	Ferrozina/Hidroxilamina	49-151µg/dl	53-167µg/dl

Nota: Os valores normais propostos neste quadro de análises hematológicas e bioquímicas foram adaptados pelo Laboratório de Bioquímica do Núcleo do Instituto de Ciências da Atividade Física da Aeronáutica (NUICAF) através do estudo de mais de 100.000 análises realizadas no Rio de Janeiro (1994 a 1997), em indivíduos normais, com resultados compreendidos entre os percentis 15% e 85% inclusive. Tabela adaptada de Cosendey⁴.

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

Os valores normais das análises bioquímicas e hematológicas realizadas neste estudo e as metodologias utilizadas estão descritas na Tab. II.

RESULTADOS

Para a avaliação foram consideradas as médias dos resultados obtidos pelas equipes e divididos por sexo.

DISCUSSÃO

São freqüentes os erros de avaliação da anemia quando da utilização do hematócrito e de hemoglobina, pois esses valores referem-se a uma medida de concentração e normalmente não se avalia o grau de hipodratatação existente⁵. Como grande parte do líquido perdido sob a forma de suor vem do plasma, a redução

TABELA III
Comparação das análises hematológicas e bioquímicas de atletas masculinos e femininos do Comitê Olímpico Brasileiro (n = 65)

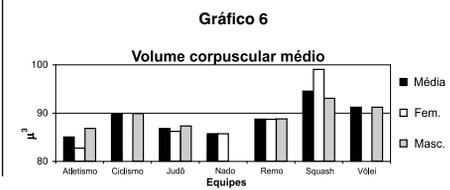
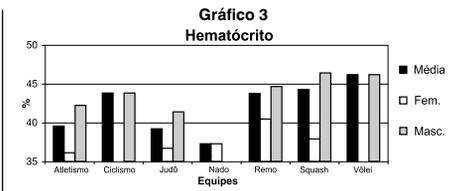
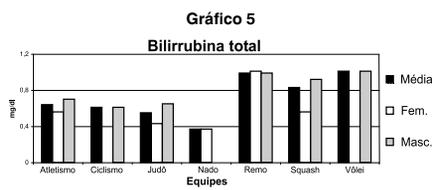
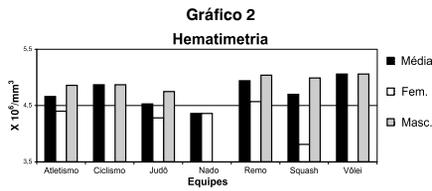
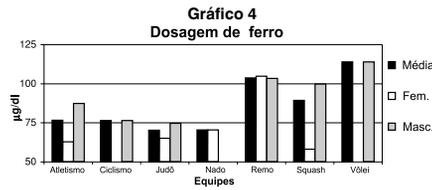
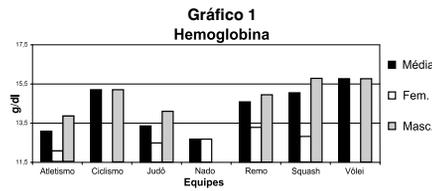
Análise	Atletismo	Ciclismo	Judô	Nado Sinc.	Remo	Squash	Vôlei
Hm (x10 ⁹ /mm ³)	4,66	4,87	4,53	4,36	4,94	4,70	5,06
Hb (g/dl)	13,04	15,18	13,34	12,67	14,57	15,03	15,75
Hct (%)	39,56	43,82	39,22	37,28	43,76	44,28	46,18
VCM (µ ³)	85,00	89,83	86,77	85,67	88,71	94,50	91,17
HCM (pg)	28,11	31,13	29,43	29,07	29,59	32,10	31,18
CHCM (g/dl)	33,02	34,58	33,98	33,90	33,34	33,95	34,17
Bt (mg/dl)	0,64	0,61	0,55	0,37	0,99	0,83	1,01
Ferro (µg/dl)	76,5	76,33	70,15	70,33	103,57	89,25	113,83

TABELA IV
Comparação das análises hematológicas e bioquímicas de atletas femininos do Comitê Olímpico Brasileiro (n = 23)

Análise	Atletismo	Judô	Nado Sinc.	Remo	Squash
Hm (x10 ⁹ /mm ³)	4,40	4,28	4,36	4,57	3,81
Hb (g/dl)	12,04	12,47	12,67	13,27	12,8
Hct (%)	36,13	36,70	37,28	40,47	37,9
VCM (µ ³)	82,71	86,17	85,67	88,67	99,00
HCM (pg)	27,59	29,15	29,07	29,07	33,60
CHCM (g/dl)	33,34	33,93	33,90	32,80	33,80
Bt (mg/dl)	0,56	0,43	0,37	1,01	0,56
Ferro (µg/dl)	62,71	65,00	70,33	104,67	58

TABELA IV
Comparação das análises hematológicas e bioquímicas de atletas masculinos do Comitê Olímpico Brasileiro (n = 42)

Análise	Atletismo	Ciclismo	Judô	Remo	Squash	Vôlei
Hm (x10 ⁹ /mm ³)	4,86	4,87	4,75	5,04	4,99	5,06
Hb (g/dl)	13,82	15,18	14,09	14,93	15,77	15,75
Hct (%)	42,23	43,82	41,39	44,65	46,40	46,18
VCM (µ ³)	86,78	89,83	87,29	88,73	93,00	91,17
HCM (pg)	28,52	31,13	29,67	29,74	31,60	31,18
CHCM (g/dl)	32,77	34,58	34,03	33,48	34,00	34,17
Bt (mg/dl)	0,70	0,61	0,65	0,99	0,92	1,01
Ferro (µg/dl)	87,22	76,33	74,57	103,27	99,67	113,83



do volume plasmático provocado pelo exercício leva a hemoconcentração¹⁰.

Foram observados baixos valores de hemoglobina nos atletas das equipes de judô, atletismo e nado sincronizado (Gráfico 1). Como os atletas se apresentaram após repouso recomendado de pelo menos 24 horas (pois, a hemoglobina diminui significativamente 24 horas após exercícios fortes, principalmente se estes estiverem associados à nutrição pobre) foi descartada a possibilidade de interferência nos resultados devido a exercícios físicos intensos, que podem reduzir o número de hemácias e conseqüentemente o valor de hemoglobina como já foi observado por outros autores^{2,7,21}. O baixo valor de hemoglobina encontrados nos atletas destas equipes pode ser atribuído a alimentação deficitária (dieta pobre em ferro)²², deficiência dos fatores relacionados à sua absorção como a vitamina B12, vitamina B6 e o ácido fólico ou então à perda durante a menstruação (no caso das mulheres)^{1,8,18,29}. A análise da hemoglobina tem grande valor na interpretação da anemia^{8,29}, já que a principal função da hemoglobina é transportar o oxigênio dos pulmões, onde sua tensão é alta, para os tecidos, onde é baixa²⁴. Se os resultados obtidos estão hemoconcentrados, a correção da hidratação baixará ainda mais os valores, tornando-se crítica uma suplementação.

As freqüentes avaliações da intensidade do exercício, que utilizam o método metabólico através do VO2 (metodologia que avalia a capacidade de captação de oxigênio pelo organismo) não se têm preocupado paralelamente com o exame da taxa de hemoglobina ou com os demais componentes da série vermelha, podendo estes resultados estar relacionados às alterações das concentrações desses componentes³.

Analisando o Gráfico 2, pode-se observar o número de hemácias reduzido verificado nos atletas do nado sincronizado, judô, atletismo, *squash* e remo (principalmente entre as mulheres). Atletas de atividade física de longa duração têm uma pequena redução no número total de hemácias^{2,7}. A alteração observada nestes atletas se deve provavelmente a alimentação deficitária, carências vitamínicas e exercícios físicos intensos.

Foram verificadas baixas concentrações de hematócrito principalmente nas mulheres (Gráfico 3). É possível que uma orientação nutricional e uma correção nas cargas de trabalho física destes atletas pode corrigir as alterações de hematócrito encontradas, pois esses valores apontam para uma deficiência nutricional decorrente da combinação de dietas inadequadas e exercícios físicos²⁶.

As deficiências de ferro séricas detectadas nos atletas de *squash*, nado sincronizado, atletismo e judô (Gráfico 4)

podem ser devidas a uma queda progressiva até valores mínimos no teor desse micronutriente que aparecem até dois dias após exercícios físicos intensos¹⁴. A manutenção da perda ou a não suplementação de ferro, vai conduzir mais tarde a uma anemia microcítica e hipocrômica (anemia ferropriva)^{19,23} com sérias implicações, limitando a performance dos atletas, pois poderá gerar todas as deficiências decorrentes de uma má oxigenação como foi verificado por Cosendey *et al*⁶.

Looker *et al.*²⁵, citado por Eichner¹², observou uma diminuição de ferro em 10% das mulheres americanas, porém não verificou tal alteração em homens, provavelmente devido a perda fisiológica que as mulheres sofrem e a ingestão deficiente deste elemento na alimentação. É praticamente certo que a deficiência de ferro na eritopoiese assim como na anemia ferropriva promovem uma diminuição no desempenho físico²². Contudo, o uso de suplementos de ferro só devem ser prescritos quando a dieta não consegue corrigir a sua deficiência, já que os excessos deste mineral inibem a absorção de zinco e, em alguns indivíduos chega a aumentar o risco de câncer, acidente vascular cerebral (AVC) e enfermidade coronariana²⁶, além de ocorrer uma hemocromatose adquirida ou hemossiderose com possibilidade de lesão hepática¹⁹.

Ao analisar o Gráfico 5, pode-se observar uma alteração dos valores de bilirrubina nas equipes de remo e de vôlei. A bilirrubina é um bom método para avaliar a formação de microhemólise (possibilidade de rompimento da parede das hemácias e conseqüente liberação de seu conteúdo de hemoglobina), que pode ocorrer em esportes de corrida (p.ex. maratona) o fenômeno chamado de "foot street hemolysis", hemólise que ocorre nos membros inferiores devido ao impacto no solo⁴. Uma hemólise intravascular também foi observada por Eichner¹¹ em alguns esportes como ginástica aeróbica, lutas, levantamento de pesos e natação, e ele definiu como hemólise desportiva, que se deve provavelmente à manutenção de estados com freqüência cardíaca elevada por longos períodos.

A macrocitose encontrada nos atletas do *squash* (Gráfico 6), pode ser devido à falta de fatores constituintes como vitamina B12 e ácido fólico que está diretamente relacionado a uma anemia macrocítica. Além disso, a deficiência dessas vitaminas favorece o acúmulo de homocisteína, que está associada a maiores riscos de doença isquêmica cardíaca e outras desordens vasculares (há indicações no sistema imunológico de que carência de vitamina B12 e ácido fólico estão associadas com depressão e fadiga⁹, como foi verificada em posterior avaliação psicológica realizada nos atletas da amostra desse estudo). Por ser um referenci-

al de tamanho da célula, o VCM, está diretamente relacionado com a classificação das anemias.

No caso da equipe de atletismo ao associar a observação dos resultados de VCM, hemoglobina e hemácias diminuídas, podemos concluir que o quadro revela uma anemia microcítica, a qual tem sua origem provável na carência de ferro²⁰. A avaliação em conjunto dos resultados das análises da série vermelha possibilita uma melhor compreensão do que está ocorrendo, quando das variações observadas nesses exames⁴.

As alterações encontradas no estudo comparativo das equipes mostram que as mulheres estão com valores diminuídos em relação aos homens em praticamente todas as análises. Na maioria das anemias, as variações de VCM ocorrem paralelamente às mudanças no peso da hemoglobina corpuscular média (HCM). A HCM representa o conteúdo médio, em massa, de hemoglobina numa hemácia individual. Portanto, notam-se alterações correlatas entre o VCM e o HCM (Gráfico 6).

Os atletas de modalidades esportivas que usam caracteristicamente os membros inferiores como o ciclismo não apresentaram diferenças significativas aos de outras modalidades que utilizam os membros superiores como o remo, ou seja, o tipo de movimento parece não interferir nos valores encontrados das análises hematológicas. Também foi detectado que não houve alteração comparando os esportes ditos aeróbios em relação aos anaeróbios²⁸.

É necessário enfatizar que, todos os atletas avaliados neste estudo estavam hipohidratados⁵, o que nos diz, que os valores para a série vermelha encontrados estão superestimados, pois os atletas estavam hemocentrados, apesar de ter sido recomendado jejum alimentar com ingestão hídrica livre. Galloway¹³ afirma que a hidratação é um fator importante que deve ser considerado antes, durante e depois do exercício.

A suplementação, tanto de vitaminas quanto de minerais, pode ser útil quando há necessidade de compensar dietas deficitárias, assegurar demandas de certos nutrientes por causa dos exercícios extremos ou corrigir alguma inadequação nutricional como afirmou Guerra¹⁵. Trabalhos desenvolvidos pela Bioquímica do Esporte em 605 indivíduos atletas e não atletas (de agosto de 2000 a maio de 2003) demonstraram que as carências de vitamina B12, vitamina B6 e ácido fólico são os maiores responsáveis pela maioria das anemias diagnosticadas e que foram corrigidos com o fornecimento somente dessas substâncias.

Os resultados encontrados neste estudo revelam algumas surpresas no tocante a qualidade de vida destes atletas. As alterações observadas são de fácil correção e possibilitariam um ganho de performance surpreendente. Apesar de todo conhecimento técnico-científico, pouco se fez para melhorar ou corrigir as deficiências encontradas. O reflexo destes resultados no quadro de medalhas foi compatível com as alterações relacionadas. Os atletas medalhistas dos jogos Pan-americanos de Winnipeg, competição que ocorreu imediatamente após a realização deste estudo, foram exatamente os atletas com menor índice de alteração dentro dos grupos avaliados, independentemente da modalidade esportiva disputada.

Ao concluir este estudo, é importante frisar que o *n* amostral reduzido por equipe, aumenta o risco dos resultados não refletirem o comportamento da população. Acredita-se, porém, que o impacto dessa limitação sobre

os resultados, ao menos no âmbito da amostra testada, não seja grande a ponto de invalidar as observações.

No que diz respeito às possibilidades de estudos futuros, algumas recomendações podem ser traçadas. Os resultados apresentados devem ser ratificados, por exemplo, pela ampliação do universo amostral. Da mesma forma, seria importante a realização de um estudo longitudinal apresentando as variações durante os períodos de treinamento, e também para verificar se estas alterações são características de nossos atletas olímpicos. É fundamental que algum controle seja feito nos atletas olímpicos como, por exemplo, o utilizado neste estudo, com o objetivo de aproximar os atletas dos seus "cem por cento" de performance.

REFERÊNCIAS

1. Campbell J.W. & Frisse M. *Manual de terapêutica clínica*. 24ª ed. (J. Neves, trad.). Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1985.
2. Cosendey A.E. & Gomes P.S.C. Utilização de parâmetros bioquímico-hematológicos na avaliação e orientação do treinamento físico de atletas de alto nível. In V. Matsudo (Ed.), *International Symposium on Sports Sciences*: Vol. 19. Saúde e desempenho (p. 134). São Paulo: Cefafiscs, 1994.
3. Cosendey A.E. & Monteiro W.D. Características hematológico-metabólicas de comandantes de grandes jatos da Aviação Civil Brasileira. In V. Matsudo (Ed.), *International Symposium on Sports Sciences*: Vol. 20. Saúde, nutrição e performance (p. 54). São Paulo: Cefafiscs, 1996.
4. Cosendey A.E. *Proposta de aprimoramento da utilização de medidas bioquímico-hematológicas como auxílio na avaliação e na orientação em programas de condicionamento físico*. Rio de Janeiro, 1997. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Educação Física – Universidade Gama Filho.
5. Cosendey A.E., Moraes M.S., Fernández C.A. & Diniz A.P.S. Avaliação da hidratação em atletas olímpicos. *International Symposium on Sports Sciences*: Vol. 24. Vida ativa para o novo milênio. São Paulo: Cefafiscs, 2001a.
6. Cosendey A.E., Moraes M.S., Fernández C.A. & Diniz A.P.S. A "evolução" da performance num time de futebol de primeira divisão do Rio de Janeiro. *III Congresso Internacional de Nutrição Esportiva*. São Paulo, 2001b.
7. Dacie J.V. & Lewis S.M. *Practical haematology*. 5ª ed. London: Churchill Livingstone, 1975.
8. Davidsohn J. & Henry J.B. *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 5ª ed. (P. L. Martínez, trad.). Barcelona: Salvat Editores S. A., 1974.
9. De Angelis R.C. Importância de alimentos enriquecidos com ácido fólico. Prevenção de enfermidades cardiovasculares. *Revista nutrição em pauta*, Mar/abr: 28-30; 2001.
10. Eichner E.R. Anemia do esportista. Terminologia inadequada para um fenômeno real. *Sports Science Exchange*, 8: 1996.
11. Eichner E.R. Should I run tomorrow? Chapter in marathon medicine 2000, *Royal Society of Medicine Press* (London), in press, 2001.
12. Eichner E.R. Anemia e formação de sangue (hematopoiese). *Sports Science Exchange*, 32: 2002.
13. Galloway S.D. Dehydration, rehydration, and exercise in the heat: rehydration strategies for athletic competition. *Can J Appl Physiol*; 24: 188-200, 1999.
14. Gleeson M., Almey J., Brooks S., Cave R., Lewis A. & Griffiths H. Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 71 (2-3): 137-142, 1995.
15. Guerra I., Soares E.A. e Burini R.C. Aspectos nutricionais do futebol de competição. *Rev Bras Med Esporte*, 7 (6): 200-206, 2001.
16. Guyton A.C. & Hall J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
17. Hardman J.G. e Limbird L.E. Goodman & Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana Editores S.A., 1996.
18. Henry J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19ª ed. São Paulo: Manole, 1999.
19. Henry J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 18ª ed. São Paulo: Manole, 1995.
20. Iovine E. & Selva A.A. *El laboratorio en la clínica*. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1991.
21. Kayashima S., Ohno H., Fujjoka T., Taniguchi N. & Nagata N. Leucocytosis as a marker of organ damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 70 (5): 413-20, 1995.
22. Kleiner S.M. O papel da carne na dieta do atleta: seu efeito na inter-relação entre macro e micronutrientes. *Sports Science Exchange*, 16: 1998.
23. Lee GR, Bithell T.C., Foerster J., Athens J.W. & Lukens J.N. *Wintrobe Hematologia Clínica*. 1ª Ed. São Paulo: Manole, 1998.
24. Lima O.A., Soares J.B., Greco J.B., Galizzi J. & Cançado J.R. *Métodos de laboratório aplicados à clínica – técnica e interpretação*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1992.
25. Looker A.C., Dallman PR., Carroll M.D., Gunter E.W. and Jonhson. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA*, 1997; 277: 973-976.
26. Matsudo S.M. Nutrição, atividade física e desempenho. *Revista nutrição em pauta*, Mar/abr: 31-37, 2001.
27. Miller O. *Laboratório para o Clínico*. 8ª ed. São Paulo: Atheneu, 1995.
28. Pini M.C. *Fisiologia esportiva*. Guanabara Koogan SA: Rio de Janeiro, 1978.
29. Tietz N.W. *Clinical guide to laboratory tests*. 3ª Ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995.

Endereço para correspondência
Avenida Djalma Batista, 3000, aptº 1112 - Torre Norte - CEP 69050-010
Bairro Chapada - Manaus - Amazonas
Tel/Fax (0xx92) 642-4291 e(0xx92) 9601-0413
E-mail: claudio.fernandez@ig.com.br

A importância dos exames laboratoriais no monitoramento da doença de Graves e artrite reumatóide*

The laboratorial tests and its importance in the clinical course of therapeutic monitoring in Graves' disease and rheumatoid arthritis

Edna Maria Vissoci Reiche¹, Nayara Delgado André², Andressa De Freitas², Egberto Munhoz² & Francieli Delongui²

RESUMO – A auto-imunidade se manifesta quando ocorre uma falha nos mecanismos de auto-tolerância responsáveis pela discriminação entre o próprio e o não próprio, desencadeando uma resposta imune adaptativa específica contra os auto-antígenos. A doença de Graves (DG), uma doença auto-imune associada com atividade excessiva da tireóide, podendo vir associada a outras doenças auto-imunes endócrinas, como *Diabetes mellitus* tipo 1, e não endócrinas como Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) ou Artrite Reumatóide (AR). As doenças auto-imunes são caracterizadas pela etiologia multifatorial, onde fatores genéticos, endócrinos, imunológicos, infecciosos, ambientais e emocionais contribuem para o desencadeamento e agravamento dos processos lesivos. Tem-se pesquisado cada vez mais a influência de fatores genéticos sobre o desenvolvimento de doenças auto-imunes e é neste contexto que se observa a forte associação do HLA-DR₄ tanto com DG como com AR. O presente trabalho tem como objetivo descrever as alterações laboratoriais observadas em uma paciente do sexo feminino, 22 anos, branca, com o diagnóstico das duas doenças auto-imunes de evolução crônica, a DG e AR, correlacionar os resultados laboratoriais com os sinais e sintomas clínicos apresentados e avaliar os exames laboratoriais realizados para o monitoramento clínico e terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE – Doença de Graves, Artrite Reumatóide, diagnóstico laboratorial, doenças auto-imunes.

SUMMARY – The autoimmunity expresses itself when a failure at self-tolerance mechanisms responsible for discrimination between self and nonself occurs, triggering a specific adaptative immune response against auto-antigens. The Graves' disease (GD), an autoimmune disease associated with excessive thyroid activity, can be associated to other autoimmune endocrine diseases such as *Diabetes mellitus* type 1, and nonendocrines such as *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE) or *Rheumatoid Arthritis* (RA). Autoimmune diseases have a multifactorial etiology and genetics, endocrines, immunological, infectious, environmental, and emotional factors are all involved and may contribute to the initial trigger and exacerbations of damage processes. The influence of genetic factors in the development of autoimmune diseases has been studied and at this very context a strong association between HLA-DR₄ and autoimmune diseases, such as GD and RA, has been described. The present study describes the laboratorial changes observed in a 22 years old female patient, with the diagnosis of two autoimmune diseases with chronic evolution, GD and RA, correlates the laboratorial results with the clinical symptoms presented and evaluates the laboratorial tests assayed to the clinical course and therapeutic monitoring.

KEYWORDS – Graves' disease, Rheumatoid Arthritis, laboratorial diagnosis, autoimmune diseases.

INTRODUÇÃO

A doença de Graves (DG) é uma doença auto-imune órgão específica, de etiologia desconhecida, responsável por 80-85% das causas de hipertireoidismo primário. Ocorre em cerca de 0,5% da população, sendo cinco vezes mais comum em mulheres. Seu pico de incidência se dá entre a segunda e quarta década de vida e há uma nítida influência genética e uma forte predisposição familiar. Fatores ambientais parecem ter um papel relevante na eclosão da doença, como gravidez (sobretudo período pós-parto), ingestão excessiva de iodo, infecções virais (induzem a expressão do HLA

DR₄ nas células foliculares), bacterianas (por exemplo, *Yersinia enterocolitica*, que apresenta reação cruzada com antígenos tireoidianos) e suspensão da terapia com glicocorticóides. Tem-se postulado também um papel do estresse como evento desencadeador⁵.

Na DG, o hipertireoidismo decorre da síntese de anticorpos que reconhecem o receptor do hormônio estimulador da tireóide (TSH), denominados TRAbs. Estes auto-anticorpos se ligam aos receptores do TSH na glândula tireóide, mimetizando o efeito do TSH, resultando em hiperatividade da glândula, com aumento da síntese dos hormônios tireoidianos¹². Pacientes com esta doença quase sempre apresentam fenômenos

Recebido em 16/4/2004
Aprovado em 24/8/2004

*Trabalho desenvolvido no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina e selecionado na VI Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina.

¹Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

²Acadêmicos do Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, UEL.

associados a exoftalmia e dermopatia^{9,12} e as manifestações clínicas do hipertireoidismo são decorrentes do efeito estimulatório dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo e os tecidos^{5,12}. Ocorre nervosismo e insônia, estado este de alta excitabilidade devido aos efeitos dos hormônios tireoidianos sobre o SNC, palpitações, uma vez que os hormônios exercem efeito direto sobre a excitabilidade cardíaca², além de aumentar o número de receptores β -adrenérgicos e amplificar a ação das catecolaminas¹, diarreia, tremores pelo aumento da reatividade das sinapses neuronais nas áreas da medula espinhal que controlam o tônus muscular², irregularidades menstruais, cansaço fácil, com incapacidade para dormir, perda de peso, devido ao metabolismo basal acelerado pelos hormônios, intolerância ao calor, sudorese intensa devido ao aumento do fluxo de sangue na pele, particularmente devido à necessidade aumentada do corpo em diminuir a temperatura corporal². O paciente apresenta caracteristicamente pele quente e úmida⁵.

A DG pode vir associada a outras doenças auto-imunes endócrinas, como *Diabetes mellitus* tipo 1, e não endócrinas como *Lupus Eritematoso Sistêmico* (LES) ou *Artrite Reumatóide* (AR).

A *Artrite Reumatóide* (AR) é uma doença inflamatória, auto-imune sistêmica, de evolução crônica e recorrente. Sua prevalência é de 3:1 em relação ao sexo feminino e masculino. Afeta, inicialmente, as pequenas articulações das mãos e dos pés e, em uma fase mais avançada, também as grandes articulações, progredindo de modo centrípeto e simétrico. Os sintomas inespecíficos incluem mal-estar, febre e perda de peso, sendo comum haver deformidades, principalmente das mãos. Manifestações extra-articulares, incluindo vasculite pela deposição de imunocomplexos nos vasos, atrofia da pele e músculos, nódulos subcutâneos, linfadenopatia, esplenomegalia e leucopenia também podem ser observadas⁹.

A AR se desenvolve devido a uma resposta imunológica específica dirigida contra um estímulo antigênico crônico em indivíduos predispostos e em condições ambientais favoráveis. Dentre os possíveis agentes etiológicos que poderiam levar ao aparecimento da doença, têm-se o vírus Epstein-Barr, certos retrovírus, parvovírus, micoplasma e micobactérias. A imunopatogenia hipotética da AR consiste na presença de um linfócito B sinovial, que, por um mecanismo ainda desconhecido, passa a produzir IgG anormal. Soma-se a este processo, a possibilidade da IgG produzida contra agentes infecciosos, expor alterações na região da porção Fc após ligação com os determinantes antigênicos dos agentes infecciosos. Ambos os processos resultam na presença de uma molécula de IgG alterada que induziria a produção de um anticorpo pelos plasmócitos sinoviais, o fator reumatóide (FR).

O FR é, na maioria das vezes, uma IgM anti-IgG anormal, podendo, no entanto, ser uma IgA ou uma IgG anti-IgG anormal, que reconhece a porção Fc da IgG anormal e os imunocomplexos resultantes podem levar à ativação das vias clássica e alternativa do complemento⁹.

O FR não é específico da AR, podendo ser detectado em infecções bacterianas ou parasitárias crônicas¹². Tem-se a iniciação e amplificação da resposta inflamatória e com a migração de polimorfonucleares (PMN) há liberação de citocinas inflamatórias, como as Interleucinas (IL) IL-1 e IL-6, as quais estimulam os osteoclastos a realizarem reabsorção óssea, podendo levar à osteoporose¹¹. Esses PMN liberam também proteínases e colagenases que lesam a cartilagem e destroem as estruturas de sustentação articulares, levando às deformidades características da AR⁹.

O presente trabalho tem como objetivo descrever as alterações laboratoriais observadas em uma paciente com o diagnóstico de AR e DG, correlacionar os resultados laboratoriais com os sinais e sintomas apresentados e avaliar os exames laboratoriais realizados para seu monitoramento clínico e terapêutico.

Relato de caso clínico

Paciente de 22 anos, sexo feminino, branca, G1A1 (gesta um, aborto um), foi atendida no Hospital Universitário (HU), em Londrina PR, em 22/04/1996, com diagnóstico de hipertireoidismo há três anos, em tratamento farmacológico com propranolol e metimazol.

Foram feitas várias modificações das doses destes medicamentos na tentativa de se obter o controle clínico dos sintomas (palpitação, dispnéia, tremores, exoftalmia, tireóide aumentada, sudorese, ansiedade) e normalização dos hormônios tireoideanos. Como não se obteve sucesso, optou-se pela tireoidectomia parcial, o que posteriormente resultou em um hipotireoidismo transitório, havendo necessidade da prescrição de Puran T4[®].

Com o decorrer do tratamento, a paciente voltou a apresentar sintomatologia de hipertireoidismo, mesmo após a suspensão do Puran T4[®], sendo encaminhada, então à radioterapia.

Após breve período de eutireoidismo, a paciente apresentou sinais de hipotireoidismo (ganho de peso, fala arrastada, sono excessivo, baixa concentração, amenorréia), o que novamente justificou a introdução do Puran T4[®], para se conseguir estabilização do quadro clínico. No mesmo período, a paciente era acompanhada pelo Ambulatório de Reumatologia do HU desde 17/07/1997, referindo que desde a gestação, em 1995, começou apresentar dor articular generalizada, que em poucos meses evoluiu para artrite, com rigidez matinal, inicialmente nas mãos, migrando para os ombros, cotovelos, joelhos e tornozelos. Fazia uso de cloroquina, prednisona, piroxicam e diclofenaco sódico. Com a evolução da doença, a paciente apresentou desvio ulnar à direita, dedo em batoadeira e nódulo de Reberdeen.

A monitorização laboratorial foi realizada através de dosagens seriadas de TSH, T4 livre; provas inflamatórias como Velocidade de Hemossedimentação (VHS), Proteína C Reativa (PCR) e alfa-1glicoproteína ácida; dosagem do FR sérico; provas bioquímicas, hematológicas microbiológicas e exames de imagem como raios-X e densitometria óssea para acompanhamento da evolução da doença, bem como, do tratamento utilizado.

TABELA I

Resultados dos exames bioquímicos realizados no período de 1997 a 2003, durante a evolução clínica e tratamento de uma paciente com doença de Graves e Artrite Reumatóide

Exame Unidade	Glicose mg/dL	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	Cálcio mg/dL	Na ⁺ mEq	K ⁺ mEq	AST U/l	ALT U/l
VR	70-110	10-50	0,5-1,4	8,4-10,2	140-148	3,6-5,2	15-37	30-65
22/07/97	66,0	31,0	0,79	-	136	4,4	-	-
01/03/00	-	-	-	-	-	-	23,0	44,0
04/08/00	67,0	17,0	-	-	-	-	-	-
10/04/01	76,0	40,0	0,66	-	-	-	-	-
04/07/02	62,0	-	0,96	7,50	142,0	3,54	-	-
10/10/02	-	-	0,88	-	-	-	-	-
05/06/03	68,0	22,0	0,73	-	-	-	32,0	56,0

VR: valor de referência; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase

TABELA III

Resultado dos exames laboratoriais realizados no período de 1997 a 2003, durante a evolução clínica e tratamento de uma paciente com doença de Graves e Artrite Reumatóide

Exame (mês/ano) Unidade	TSH (μUI/ml)	T4L (ng/dL)	Colesterol total mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl
VR	0,490-4,670	0,71-1,85	<200	>65	<130
06/97	0,003	0,95	-	-	-
10/98	<0,001	-	-	-	-
12/98	0,18	-	-	-	-
11/99	0,250	0,97	-	-	-
03/00	0,42	1,49	-	-	-
08/00	0,001	1,54	-	-	-
04/01	0,022	1,21	200	61	125
07/91	46,721	0,01	-	-	-
01/02	48,92	-	-	-	-
07/02	17,015	1,02	223	67	142
10/02	26,489	0,90	-	-	-
02/03	2,371	1,40	-	-	-
06/03	11,890	1,11	-	-	-

TSH: hormônio estimulante da tireóide; T4L: Tireoxina Livre; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VR: valor de referência; -: exame não realizado.

O hemograma completo (eritograma, leucograma e contagem diferencial de leucócitos), exame de Urina I e urocultura realizados ao longo de todo o período avaliado não apresentaram alterações significativas.

Na evolução do quadro clínico, em 04/08/2000, a dosagem de proteínas totais apresentou 6,72g/dL (VR: 6-8g/dL); a eletroforese de proteínas demonstrou 37,10% de albumina (VR: 50-60%), 4,7% de fração α₁-globulinas (VR: 3-6%), 14,90% de fração α₂-globulinas (VR: 7-11%), 17,40% de β-globulinas (VR: 11-16) e 25,90% de γ-globulinas (VR: 15-22%). A dosagem de complemento sérico se encontrava dentro dos valores de referência com CH50 de 81uds/mL (VR: 55-110uds/mL); C₃ de 160 mg/dL (VR: 101-186mg/dl); C₄ de 17mg/dl (VR: 16-47mg/dl). Os resultados dos demais exames laboratoriais realizados no período estão sumarizados nas Tabs. I, II, e III.

TABELA II

Resultado das provas laboratoriais de atividade inflamatória e imunológicas realizadas no período de 1997 a 2003, durante a evolução clínica e tratamento de uma paciente com doença de Graves e Artrite Reumatóide

Exame Unidade	α ₁ gp ácida g/L	VHS mm/h	PCR mg/L	FAN	ANCA	FR UI/mL	WR uds/mL	TRABs U/L
VR	0,4-1,2	até 20	< 6,0	NR	NR	< 15	< 16	<15
22/07/97	-	57	6,5	-	-	1,80	4	-
15/10/98	0,99	38	-	-	NR	97	4	-
02/02/99	0,83	-	-	NR	-	56,30	4	-
01/03/00	0,89	68	-	-	-	-	-	129,0
04/08/00	0,86	12	-	-	-	-	-	-
20/02/01	-	50	-	-	-	<10	-	2,7
21/04/01	-	-	-	-	-	-	-	-
21/01/02	-	50	-	-	-	<10	-	-
04/07/02	-	22	-	-	-	182,9	-	-
10/10/02	-	48	-	-	-	337,2	-	-
05/02/03	-	33	-	-	-	199,8	-	-
05/06/03	-	31	-	-	-	-	-	-

VR: valor de referência; α₁ gp ácida: α₁ glicoproteína ácida; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: Proteína C Reativa; FAN: Fator anti-núcleo; ANCA: anticorpos anticitoplasma de neutrófilos; RF: Fator Reumatóide; WR: reação de Waaler-Rose; TRABs: anticorpo anti-receptor de TSH; NR: Não reagente; -: exame não realizado.

DISCUSSÃO

Fatores como gestação, eventos estressores, agentes virais e bacterianos têm sido cada vez mais estudados no desencadeamento e/ou agravamento de doenças auto-imunes. Uma gestação em paciente com quadro clínico de hipertireoidismo não controlado implica em risco aumentado de prematuridade (até 45%), natalidade (até 25%), malformações congênitas fetais (anencefalia, ânus imperfurado e lábio leporino), DG neonatal, geralmente transitória e secundária à passagem transplacentária de TRABs, e abortamento espontâneo, como ocorreu com a paciente do caso relatado⁵. No início da gestação, com o aumento de progesterona e diminuição de estrogênio, tem-se uma predisposição para o desenvolvimento de doenças auto-imunes com perfil inflamatório, uma vez que se tem o predomínio de uma resposta imunológica padrão Th1, o que caracteriza o quadro inicial de AR apresentado pela paciente. Posteriormente, com o aumento do estrogênio, há um direcionamento para resposta imune com padrão Th2, resposta mediada por anticorpos, explicando os títulos elevados de TRABs e de FR detectados neste caso clínico².

Pacientes com AR apresentam artralgia mais intensa pela manhã uma vez que o cortisol, um hormônio antiinflamatório endógeno, apresenta diminuição de sua concentração sanguínea durante a noite e, além disso, a prolactina, um hormônio pró-inflamatório, apresenta aumento de sua concentração sérica durante a noite. Ocorre melhora da sintomatologia com o decorrer do dia devido ao ciclo circadiano desses dois hormônios¹¹.

A paciente do presente caso apresentou 5 dos 7 critérios definidos pela Associação Americana de

Reumatologia (rigidez matinal, artrite de três ou mais áreas articulares, artrite das articulações das mãos, artrite simétrica e fator reumatóide sérico), o que possibilitou o diagnóstico de AR. Para o diagnóstico da AR não há um exame laboratorial específico. Os exames realizados caracterizam um processo inflamatório e auto-imune que são complementares ao quadro clínico apresentado pela paciente. O FR é o marcador sorológico mais importante, observado em mais de 75% dos pacientes⁹, embora não seja específico para AR, podendo estar presente em outras doenças auto-imunes e infecções bacterianas ou parasitárias crônicas⁶. Existem vários testes disponíveis no laboratório para a detecção do FR. O teste de aglutinação do látex é um método comumente utilizado, considerado sensível, embora não específico. O teste do látex vem sendo substituído pela nefelometria, um método automatizado, sensível, quantitativo, rápido e de fácil execução⁶. Outra técnica utilizada para se detectar o FR é o teste de Waaler-Rose que emprega eritrócitos de carneiros sensibilizados com IgG de coelho. Embora seja mais específico, perde em sensibilidade para a prova de aglutinação em látex, geralmente não sendo positivo na fase inicial da doença. No entanto, se ocorrer soropositividade nesta fase, a evolução tende a ser mais grave.

As provas de atividade inflamatória estão relacionadas ao aumento de proteínas de fase aguda, avaliadas a partir da dosagem da PCR, alfa 1 glicoproteína ácida e VHS. A PCR tem a particularidade de encontrar-se elevada no soro de pacientes acometidos de uma infecção em período reativo, assim como a alfa 1 glicoproteína ácida⁶, mostrando-se útil na avaliação da atividade do processo reumático. A elevação da VHS correlaciona-se com a doença ativa, apesar de ser uma prova inflamatória inespecífica. O diagnóstico precoce é fundamental para o tratamento mais adequado, bem como o uso preciso de agentes para reduzir a possibilidade de danos articulares irreversíveis. O tratamento empregado consiste em fisioterapia, agentes antiinflamatórios não esteróides (AINEs), agentes antimaláricos, tratamento com sais de ouro, penicilaminas, sulfasalazina, corticosteróides, imunossuppressores, suporte emocional e cirurgia¹¹.

A doença articular que se inicia de maneira aguda e explosiva tende a ter uma evolução melhor do que aquela de início insidioso. O sexo feminino, idade menor de 30 anos no início da doença, presença de nódulos reumatóides, elevados títulos de FR e a presença do alelo HLA DR₄ constituem fatores de prognóstico desfavorável para a AR⁹. O acompanhamento de pacientes depois de 10-15 anos de evolução mostra que 50% apresentam melhora ou permanecem estacionários, 70% são capazes de manter o seu emprego e 10% tornam-se totalmente incapacitados. Os casos fatais estão mais freqüentemente associados a *seps*e ou a complicações do tratamento⁹.

O diagnóstico de DG é feito através da identificação de TRAbs, marcador sorológico específico, indicando doença ativa⁵; da identificação de anticorpos anti-tireoideanos como anti-tireoperoxidase (anti-TPO), presentes em 50-80% dos casos de DG e 80-90% dos

casos de Tireoidite de Hashimoto, e anti-tireoglobulina, presentes em 20-40% dos casos de DG e 40-70% dos casos de Hashimoto⁹, dosagens de TSH, T₄ total e T₄ livre. A presença de bócio aumentado e difuso assimétrico ou lobular, com volume variável, exoftalmia e dermatopatias também são sinais clínicos importantes para o diagnóstico de DG^{5,9}. O tratamento consiste no emprego de antagonistas dos receptores β-adrenérgicos, como o propranolol, que possuem efeitos sobre as manifestações decorrentes de hiperatividade adrenérgica (nervosismo, insônia, taquicardia, palpitações, tremor, sudorese, etc) e inibem a conversão periférica do T₄ em T₃, drogas anti-tireoidianas (tionamidas periféricas) como propiltiouracil e metimazol, com vantagens sobre o último por poder ser administrado em dose única e ter custo menor, o que melhora a adesão do paciente ao tratamento^{5,8}. O propiltiouracil, além de inibir a síntese dos hormônios tireoidianos por inibir a iodação dos radicais de tirosil na tireoglobulina, age periféricamente reduzindo a desiodação do T₄ em T₃ nos tecidos periféricos⁸. O prognóstico é muito bom para a maioria dos pacientes uma vez que esteja estabelecido o controle da função tireoidiana. Os problemas mais graves provêm quase sempre da oftalmopatia e dermatopatia associadas⁹. A exoftalmia pode provocar estiramento do nervo óptico e ressecamento e irritação da superfície do olho, com possibilidade de ulceração da córnea⁵. O tratamento com imunossuppressores pode ter sucesso na estabilização do quadro, já que se trata de um processo auto-imune⁹.

A primeira opção de tratamento do hipertireoidismo é a intervenção farmacológica. Após 6 a 8 semanas de tratamento devem ser realizados novos exames, aumentando a dosagem da medicação caso o paciente persista hipertireóide. Uma vez atingido o eutireoidismo, após 4 a 8 semanas, deve-se reduzir a dose para metade e posteriormente para um terço da quantidade inicial, até que seja obtida a menor dose que mantenha o paciente eutireóide. Para a avaliação da evolução da doença e estabelecimento de um tratamento correto é imprescindível o monitoramento laboratorial através de dosagens seriadas dos hormônios TSH e T₄L, T₄Total e T₃⁵.

No presente caso clínico, o tratamento farmacológico já tinha sido estabelecido há três anos, sem obter, no entanto, controle da doença. Pacientes com níveis elevados de T₃ ao final do tratamento tem maior chance de apresentar recidivas⁵. Alguns meses após aumento da dose de metimazol, de 40mg para 60mg, foi novamente pedida dosagem hormonal cujos valores obtidos foram TSH de 0,003μUI/mL e T₄L de 0,95ηg/dL, persistindo o quadro de hipertireoidismo primário. Sem obtenção de efeito terapêutico necessário, a paciente foi submetida à tireoidectomia parcial no ano de 1997. A recidiva do hipertireoidismo pós-cirurgia tem sido relatada em 0,6 a 28% dos pacientes, em média 10%, geralmente dentro dos primeiros anos, mas, 40% dos casos recidivantes manifestam-se após 5 anos. Dois meses após a realização da cirurgia, devido à manifestação de sintomas de hipotireoidismo, foi introduzido o Puran T₄[®], 100mcg/dia. Com manutenção da sintomatologia, a dose de Puran T₄[®] foi aumentada para 125mcg/dia. Um ano após a realização da ti-

reoidectomia parcial, a paciente voltou a apresentar sintomas característicos de hipertireoidismo (dispnéia, quadros de ansiedade, exoftalmia discreta) quando a dose de Puran T₄[®] foi diminuída gradativamente. A recidiva das manifestações foi acompanhada pela dosagem hormonal e após resultado de T₄ de 14ng/dL (VR:4,5 -11,0ng/dL) a medicação foi suspensa. A paciente, sem medicação para tireóide, foi acompanhada por alguns meses e observou-se a instalação de um quadro de hipertireoidismo subclínico, com TSH muito suprimido, T₄L dentro dos valores de referência e T₄ acima dos valores de referência. A dosagem do TRAb pelo método de enzimaímunoensaio (Elisa) apresentou valores de 129,0 U/L (<10 não reagente; 10-14:limítrofe e >14:reagente) indicando grande probabilidade de recidiva da DG (Tab. II). A paciente foi então encaminhada para Iodoterapia em março de 2001. A I¹³¹ tem sido usado como terapia definitiva para hipertireoidismo, sendo considerada o tratamento de escolha para pacientes com mais de 21 anos. As principais contra-indicações são gravidez, bócios muito volumosos, recusa da paciente e oftalmia infiltrativa importante, sendo a principal complicação, o hipotireoidismo. Quando este se desenvolve ou persiste após um ano, ele é quase sempre permanente. Após a Iodoterapia, a paciente se manteve eutireoidiana por cerca de 3 a 4 meses, tempo este necessário para a ação desta intervenção. A paciente foi acompanhada com dosagens de TSH e T₄L que mostraram um quadro de hipotireoidismo subclínico, ou seja, TSH muito aumentado, T₄L dentro dos valores de referência e T₄ abaixo dos valores de referência. A paciente foi constantemente monitorada a fim de se definir a dose de Puran T₄[®] necessária para o quadro clínico de eutireoidiana.

A VHS é um exame inespecífico, que se encontra aumentado tanto em processos infecciosos, inflamatórios quanto em situações fisiológicas normais (pacientes idosos, gravidez, menstruação). Durante os 6 anos de acompanhamento do quadro de AR descrito, todos os exames de VHS mostraram resultados acima dos valores de referência (Tab. II), correlacionando-se com o quadro clínico de AR ativa. Quanto à determinação do FR, todas as dosagens apresentaram altos títulos (Tab. II), o que está relacionado com doença mais agressiva e de pior prognóstico. O teste de Waaler-Rose apresentou valores abaixo de 16uds Rose/ml, associado a níveis elevados de FR pelo método de nefelometria, confirmando a menor sensibilidade do teste e sugerindo um quadro de AR soro-dissociada.

As proteínas de fase aguda positivas mostraram-se dentro dos valores de referência, indicando que a AR já se encontrava em uma fase mais avançada, evoluindo para a cronicidade. O hemograma foi realizado rotineiramente no período de acompanhamento da paciente com o objetivo de não só avaliar a evolução da doença, pois doenças crônicas comumente cursam com o desenvolvimento de anemia, como também para a detecção de efeitos adversos dos medicamentos utilizados. A paciente fazia uso de metimazol, que está relacionado a casos de agranulocitose^{5,8}; metotrexato, que pode levar ao desenvolvimento de mieloaplasia e do piroxicam, que pode causar leucopenia. No entanto, no período avaliado não se verificou alterações hematológicas significativas.

Os exames bioquímicos foram solicitados com o objetivo de acompanhar possíveis complicações relacionadas, tanto com a evolução das doenças apresentadas como com o tratamento com medicamentos potencialmente tóxicos ao organismo. Nas fases distintas do tratamento, fase hipertireoidiana, eutireoidiana e hipotireoidiana, não se observou uma variação significativa dos níveis de glicose (Tab. I).

O hormônio tireoidiano estimula a absorção intestinal dos carboidratos, através de mecanismos independentes da mudança do fluxo sanguíneo regional. Da mesma forma, estimula a produção hepática de glicose (gliconeogênese), o que contribui para um aumento da entrada de carboidratos no plasma. Por outro lado, o desaparecimento plasmático e a entrada de glicose nas células também são estimulados pelo hormônio tireoidiano, provavelmente através de um aumento da secreção de insulina. A nível celular, o hormônio tireoidiano contribui para utilização de glicose, através da ativação de alguns ciclos de substratos que fazem parte da via glicolítica¹. Um outro fator que poderia levar a uma hipoglicemia seria o propranolol que a paciente fazia uso, uma vez que esta droga por ser antagonista β-adrenérgico inibe a atividade das catecolaminas⁸. O doseamento de sódio, potássio, uréia, creatinina e exames de urina I são úteis no monitoramento de possível comprometimento renal, que pode ser causado não só pelos mecanismos de auto-imunidade mediados por imunocomplexos, como também pelo uso prolongado de drogas nefrotóxicas como metotrexato, que pode levar à insuficiência renal aguda, e o piroxicam que também pode causar danos renais¹¹. O exame de urina I foi solicitado como avaliação de triagem da função renal, visto que a paciente fazia uso de medicamentos com potencial efeito nefrotóxico e pela possibilidade de lesão renal por deposição de imunocomplexos. Os traços de hemoglobina encontrados na urina de 01/03/2000 poderiam ser justificados por processos fisiológicos, ao considerar que os demais parâmetros da urinálise encontravam-se dentro dos valores referenciais. A urocultura foi solicitada uma vez que a paciente fazia uso de diversos imunossupressores que poderiam predispor à infecções do trato urinário. A obtenção de resultados dentro dos valores de referência afasta a possibilidade de complicações renais (Tab. I). As dosagens das enzimas intracelulares ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram solicitadas para análise da função hepática uma vez que a paciente fazia uso prolongado do metotrexato que pode levar à fibrose hepática, assim como a hepatotoxicidade por tioamidas⁵. Todas as dosagens realizadas apresentaram resultados dentro dos valores de referência. O doseamento de cálcio, realizado já em uma fase posterior de evolução da doença, quando a paciente já cursava com hipotireoidismo, apresentou níveis séricos abaixo dos valores de referência, o que pode ser explicado pela diminuição da albumina sérica em decorrência da existência de doença crônica e pela diminuição da secreção do Paratormônio (PTH) pela paratireóide, provavelmente lesada durante o processo de tireoidectomia parcial e posteriormente pela Iodoterapia.

Durante a resposta de fase aguda, há diminuição da síntese de várias proteínas (proteínas de fase aguda negativas), entre elas a albumina e pré-albumina. Em situações de hipoalbuminemia, há diminuição da ligação com o cálcio, levando a diminuição dos níveis de cálcio total. O ideal seria a mensuração do cálcio iônico, que refletiria com mais fidelidade os níveis séricos da fração deste analito que apresenta atividade biológica³. Quanto ao PTH, por exercer uma atividade de indução de reabsorção óssea, quando se encontra diminuído a calcemia também se encontrará diminuída. A diminuição do cálcio ligado não implica em diminuição do cálcio livre, que por sua vez pode estar normal ou aumentado, o que está de acordo com a ausência de comprometimento ósseo avaliado pelos valores normais de fosfatase alcalina, de 41U/L (VR: 20-48U/L) e resultados normais de Raios-X e Densitometria Óssea, que periodicamente eram solicitados durante evolução da AR.

Em relação à eletroforese de proteínas, as alterações observadas eram compatíveis com doença de evolução crônica: diminuição da síntese hepática de albumina; elevação da fração α_2 -globulina, pela maior quantidade de α_2 -macroglobulina, compensando a diminuição da albumina na circulação e a elevação da γ -globulina pela estimulação crônica da resposta auto-imune³.

As hipóteses que explicariam as alterações lipídicas encontradas no dia 04/07/02, seriam catabolismo e depuração da LDL diminuídos, diminuição da conversão do colesterol para ácido biliar, diminuição da secreção do colesterol para a bile, diminuição do número de receptores B100 para a LDL⁷ e alteração a quantidade de HDL¹⁰. Durante o processo inflamatório há elevação semelhante das proteínas PCR e Proteína Sérica Amiloide A (SAA). A SAA circula no plasma ligada à HDL, podendo compreender de 25 a 50% da lipoproteína. Estudos têm demonstrado que a SAA não deslocaria a apolipoproteína (Apo AI) da HDL, de forma que a redução dos níveis de HDL durante a resposta de fase aguda parece ser secundária à redução da síntese de Apolipoproteínas, antes de uma substituição pela SAA. Durante a resposta de fase aguda, há diminuição da síntese de várias proteínas (proteínas de fase aguda negativas), não só a albumina, pré-albumina e transferrina como também as Apo AI. A função da SAA seria a interferência no metabolismo do colesterol. Durante a resposta de fase aguda, a SAA se associa à 3ª fração da HDL (HDL3), tornando-se a apolipoproteína predominante. Através da interação com a HDL3 ocorre redirecionamento do transporte do colesterol, a partir dos hepatócitos para os macrófagos, que, então, fagocitam o colesterol e o débris lipídico dos sítios de necrose. Assim, o excesso de colesterol seria excretado ou poderia ser redistribuído para uso no reparo tecidual. Esta alteração do transporte de colesterol, entretanto, pode ser deletéria no processo inflamatório crônico. A redução da concentração sérica de HDL, que ocorre na resposta de fase aguda, associada à menor capacidade da HDL em mediar o transporte reverso do colesterol (pela substituição da Apo AI), pode predispor ao desenvolvimento de aterosclerose e complicações cardiovasculares em pacientes com doenças inflamatórias crônicas como a

AR¹⁰. A secreção diminuída da glândula tireóide, no hipotireoidismo prolongado, aumenta as concentrações plasmáticas de colesterol, fosfolípidios e triacilgliceróis que podem provocar deposição excessiva de gordura no fígado e nos vasos, predispondo à fenômenos de aterosclerose².

O complemento sérico poderia estar diminuído em casos de AR com vasculite, o que não foi observado no presente caso¹¹. A pesquisa do anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) é útil como diagnóstico diferencial da Doença de Wegener, doença com manifestação clínica de artrite/artralgia em 60% dos casos e que apresenta especificamente ANCA positivo⁹.

CONCLUSÃO

O caso clínico descrito é um exemplo da importância dos exames laboratoriais no monitoramento da evolução e tratamento de pacientes com diagnóstico de doenças crônicas como a DG e a AR. A correlação dos resultados laboratoriais com o quadro clínico do paciente permite ao médico a tomada de condutas como introdução, retirada ou alteração da dose dos medicamentos, associação com outras drogas, propor outras terapias como cirurgias ou a iodoterapia, avaliar complicações e fatores de risco para o desenvolvimento de outras manifestações clínicas como a anemia, aterosclerose, lesão hepática e renal e a osteoporose.

REFERÊNCIAS

1. Aires, M.M. Fisiologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
2. Guyton, A.C.; Hall, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
3. Henry, J.B. Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais. 18ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1995.
4. Janeway, C.A.; Travers, P.; Schlomchite, M.W.M. Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2002.
5. Jeffcoate, W.; Rea, R.; Vilar, L. Diagnóstico e Tratamento da doença de Graves. In: Vilar, L. *et al.* Endocrinologia Clínica. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 237-264.
6. Miller, O.; Gonçalves, R.R. Laboratório para o clínico. 8ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999, p. 502-514.
7. Moreira, T.D.; Scarsanella, M.J.S.; Wagner, R.; Gall, M.C.; Mascarenhas, M.A. Incidência do Hipotireoidismo Co-Relacionado a Alterações Lipídicas e a Importância da Investigação Laboratorial. www.newslab.com.br/edição43.htm.
8. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 355-361.
9. Sack, K.E.; Fye, K.H. Doenças Reumáticas. In: Stites, D.P.; Terr, A.I.; Parslow, T.G. Imunologia Médica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.356-360.
10. Serra, C.R.B. Contribuição das proteínas de fase aguda na monitorização das doenças reumáticas. Revista Brasileira de Reumatologia, 37(3): 152-158, 1997.
11. Skare, T.L. Reumatologia - Princípios e Prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
12. Wunder, P.R. Doenças auto-imunes. In: Ferreira, A.W.; Ávila, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 420-422.

Endereço para correspondência

Edna Maria Vissoci Reiche
Centro de Ciências da Saúde,
Deptº de Patologia,
Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária, Londrina - PR - 86038-440

Ceratomíose causada por *Fusarium solani* no interior do Rio Grande do Sul, Brasil

Keratomycosis by *Fusarium solani* in hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil

Patrícia Abelin Vargas¹, Lisiane Piltz² & Sydney Hartz Alves³

RESUMO – As ceratomíoses são infecções decorrentes da invasão de fungos na córnea. Embora as espécies fúngicas implicadas nestas infecções sejam muito diversas e *Fusarium solani* tem sido isolada com frequência crescente. Relatamos um caso de ceratomíose causada por *Fusarium solani* no interior do Rio Grande do Sul, chamando a atenção para a importância dos procedimentos microbiológicos adequados para o sucesso do tratamento e cura do paciente.

PALAVRAS-CHAVE – Ceratomíose, Oculomíose, *Fusarium solani*.

SUMMARY – Keratomycosis is a disease caused by fungal invasion of the corneal stroma. Although the fungal species are extremely diverse and the *Fusarium solani* has been shown to be predominant in different regions of the world. This study presents a case diagnosed and treated in hinterland of Rio Grande do Sul state, attending the importance of the correct microbiological procedures for the success of the medical management and cure of the patient.

KEYWORDS – Keratomycosis; mycosis; *Fusarium solani*.

INTRODUÇÃO

Os fungos se constituem em importante causa de doença infecciosa do olho, e cuja frequência tem sido mundialmente crescente^{8,12}. Dentre as micoses oculares, as ceratites acometem grande número de indivíduos e se constituem em grave problema ocular uma vez que pode resultar em severo comprometimento da visão como a cegueira monocular^{9,11}.

As ceratites fúngicas são geralmente causadas por fungos filamentosos septados, mais frequentes em regiões de clima tropical e subtropical. Estão associadas a traumatismos envolvendo matéria vegetal ou esférulas contaminadas pelo solo, e apesar da presença de muitos fungos saprófitas compondo a microbiota conjuntival, é necessário a ruptura do epitélio corneano para que ocorra a sua penetração^{5,8,10}.

A ceratite fúngica pode ser reconhecida pela presença de um grosseiro infiltrado granular no epitélio da córnea e no estroma anterior, ocorrendo dentro de 24 a 36 horas após o trauma^{8,11,12}.

A reação inflamatória apresenta início insidioso com infiltrado esbranquiçado ou branco-acinzentado, lesões finas ou granulares, de localização intra-epitelial ou estromal e pouca reação celular na câmara anterior^{1,2,12}; o epitélio pode estar intacto, elevado ou ulcerado^{5,13}. Com a evolução da lesão, os fungos se aprofundam no tecido corneano, aumentando a área de necrose^{2,3,4,8}.

Geralmente o processo infeccioso evolui lentamente e os sintomas gradativamente vão se tornando mais evidentes, trazendo desconforto intenso com dor, fotofobia, lacrimejamento, sensação de corpo estranho, olho avermelhado e hipópio^{4,8,13}.

Clinicamente, não há sinais e/ou sintomas que possam indicar, com segurança, o agente etiológico envolvido. Todavia, lesões corneanas com margens hifadas, epitélio elevado e aspecto seco são sugestivas de ceratite micótica causada por fungos filamentosos^{8,13}. Em contrapartida, lesões com margens não hifadas e com infiltrados densos bem definidos, sugerem agressão por fungos leveduriformes^{5,12,13}.

O exame clínico é insuficiente para o estabelecimento do adequado diagnóstico, pois, bactérias, vírus e parasitas podem determinar quadros clinicamente semelhantes^{7,8}.

Neste contexto, os exames laboratoriais constituem-se em recursos imprescindíveis no diagnóstico das úlceras corneanas^{3,8,12}. A seguir, relatamos um caso de ceratite fúngica ressaltando-se a importância do diagnóstico laboratorial como fundamento para a instituição do adequado tratamento e boa evolução do quadro clínico.

Relato do caso

Em 12/04/2001, LMKG, 36 anos, branca, do sexo feminino, agricultora, buscou atendimento oftalmológico na cidade de Santo Ângelo (RS) queixando-se de dor, visão borrada e lacrimejamento excessivo há 1 mês, sendo, nesta ocasião, submetida a exame clínico oftalmológico completo que evidenciou úlcera corneana central no olho esquerdo. A paciente foi encaminhada ao Laboratório Oswaldo Cruz (Santo Ângelo, RS) para exames bacteriológico e micológico completos sendo prescrito cefazolina sistêmica e colírio de tobramicina fortificado. A colheita foi realizada com espátula de

Recebido em 7/1/2004
Aprovado em 9/9/2004

¹Farmacêutica-Bioquímica. Curso de Especialização em Análises Clínicas. Dept^o de Análises Clínicas e Toxicológicas. UFSM. Santa Maria, RS, Brasil;

²Farmacêutica-Bioquímica. Laboratório Oswaldo Cruz. Santo Ângelo-RS, Brasil;

³Prof. Adjunto. Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). Departamento de Microbiologia e Parasitologia. UFSM. Santa Maria, RS, Brasil.

Kimura e consistiu de raspagem no centro e bordas da lesão após instilação de colírio anestésico. O material foi inicialmente semeado em ágar-sangue e ágar Sabouraud acrescido de gentamicina e caldo tioglicolato⁶. Nos meios sólidos, as sementeiras foram realizadas com a espátula desenhando-se a letra C, nos quatro quadrantes de cada placa. A seguir, confeccionaram-se esfregaços para Gram, Giemsa, e ainda exame direto com salina glicosada¹⁴. O esfregaço corado pelo Gram permitiu a observação de hifas regularmente septadas sugerindo hifomicetos hialinos. O cultivo em ágar Sabouraud-gentamicina, após 4 dias de incubação a 25°C, evidenciou o crescimento de colônia esbranquiçada com micélio aéreo bem evidente. O estudo da micromorfologia após subcultivo em ágar batata confirmou tratar-se de *Fusarium solani*⁶. O tratamento foi alterado, associando-se o colírio de Pimaricina® com cetoconazol 200mg via oral. A cefazolina e o colírio de tobramicina, inicialmente indicados, foram, então, descontinuados. A paciente evidenciou evolução para cura com desaparecimento dos sintomas embora persistindo um leucoma corneano central, com baixa da acuidade visual importante, sendo-lhe indicado o transplante de córnea.

DISCUSSÃO

As úlceras corneanas se constituem numa das principais causas de perda de visão, e, embora frequentemente respondam aos medicamentos tópicos, podem requerer transplante de córnea^{1,2,3}. A etiologia micótica é cada vez mais frequentemente relatada, todavia, os diagnósticos tardios ainda ocorrem^{12,13}.

Nas ceratites fúngicas, o trauma é o grande fator desencadeante, envolvendo, via de regra, participação de materiais vegetais e acometendo populações do meio rural. Outros fatores como o uso indiscriminado de colírios a base de corticosteróides, cirurgias oculares, manipulação de ferida operatória e o uso de lentes de contato também são de relevância inconteste^{5,13}.

Em nosso meio, os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos incluem espécies de *Fusarium*, com mais da metade dos casos seguido de espécies de *Candida*¹³.

A investigação laboratorial é fundamental para o diagnóstico, pois, o aspecto clínico, de modo geral, não permite fazê-lo^{3,6,8,9,10,12,13,14}. Tal investigação deve incluir exames microbiológicos com o material obtido do raspado da córnea, empregando-se colorações de Gram, Kinyoum e cultivos. A biópsia da córnea estará indicada quando os raspados corneanos forem negativos, todavia, as suspeitas clínicas deverão estar bem fundamentadas^{3,6}.

Na clínica oftalmológica, os tratamentos antifúngicos recaem sobre os poliênicos, azólicos ou derivados pirimidínicos, com destaque para o poliênico natamicina. A natamicina se constitui no agente de primeira linha nas ceratites por *Fusarium* e outros, uma vez que

evidencia efeitos tóxicos menos intensos do que a anfotericina B. É oportuno ressaltar que a natamicina (Pimaricina®) é o único antifúngico tópico comercialmente disponível^{4,7}.

Clinicamente, a cura é evidenciada pelo arredondamento das margens e redução das dimensões das lesões acompanhado de redução da intensidade dos infiltrados¹. No presente estudo os procedimentos laboratoriais como colheita, isolamento e identificação do patógeno foram fundamentais para nortear o tratamento, o que determinou bom prognóstico ocular, todavia, permanecendo uma importante seqüela visual.

AGRADECIMENTOS

Aos oftalmologistas: Dr. Flávio Vendramin (Santo Ângelo; RS); Dr. Álvaro Rossi (UFMS; Santa Maria, RS) e Dr^a Márcia Abelin Vargas (USP; Ribeirão Preto), pelas sugestões no texto.

REFERÊNCIAS

1. Abad, J.C.; Foster, C.S. Fungal keratitis. *Int. Ophthalmol Clin* 36: 1-15, 1996.
2. Albert, D.M.; Dryja, T.P. Córnea; inflamações ucerativas. In: Cotran RS, Kumar, V.; Robbins, SL. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.
3. Asbell, P.; Stenson, L.S. Ulcerative keratitis survey of 30 years laboratory experience. *Arch. Ophthalmol.* 100: 77, 1982.
4. Cullom, Jr, R.D.; Chang, B. *Manual das Doenças Oculares. Diagnóstico e Tratamento Emergencial das Doenças Oculares*. 2ª ed. Cultura Medica, Rio de Janeiro, 1998.
5. Foster, C.S. Fungal keratitis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 6: 851, 1992.
6. Isemberg, H.D. (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Am. Soc. Microbiol., Washington, 1992.
7. Jones, D.B. Decision-making in the management of microbial keratitis. *Ophthalmology* 88: 814-820, 1981.
8. Klotz, A.S.; Penn, C.C.; Negvesky, G.J.; Butrus, S.I. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol. Rev.* 13(4): 662-685, 2000.
9. Oliveira, A.D.D. Correlação clínico-laboratorial de úlceras infecciosas da córnea. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 65: 431-434, 2002.
10. Rosa, H.R.; Miller, D.; Alfonso, E.C. Changing spectrum of fungal keratitis in southern Florida. *Ophthalmology* 101: 1005, 1994.
11. Srinivasan, M.; Gonzáles, C.A.; George, C.; Cavallos, V.; Mascareñas, J.M.; Asokan, B. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madirai, South India. *Br.J. Ophthalmol.* 81: 965-971, 1997.
12. Thomas, P.A. Mycotic keratitis – an underestimated mycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 235-256, 1994.
13. Vieira, L.A.; Belfort, Jr. J. Ceratite Micótica. In: Belfort Jr., Kara-José, N. *Córnea Clínica-cirúrgica*. São Paulo, Rocca; 1996.p. 189-203.
14. Wilhelmus, K.R.; Liesegang, T.J.; Osato, M.S.; Jones, D.B. – Laboratory diagnosis of ocular infections. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology (CUMITECH) 13A*. American Society for Microbiology, Washington, USA, 1994.

Endereço para correspondência

Sydney Hartz Alves
Rua Venâncio Aires, 2766/403 – 97010-004
Santa Maria – RS
Tel.: (0xx55)220-89906
E-mail: hartzsa@ccs.ufsm.br

Atualização cadastral

A SBAC reitera aos sócios e colaboradores atualizar dados como: endereço, telefone, fax, e-mail, dentre outros, através de fax (0xx21) 2204-0245 ou 2264-4449 e também pelo e-mail: sbac@sbac.org.br

Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram Negativos Não Fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - CE*

Infection and antimicrobials profile resistance from Nonfermentative Gram Negatives Bacilli isolated in the Patological Clinic Laboratory Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia, Fortaleza, Ceará

Everardo Albuquerque Menezes¹, Fábio Vanderlan Viana Macedo¹, Francisco Afrânio Cunha¹, Maria do Socorro de Sena Andrade² & Maria Valdenir Abreu de Paula Rocha²

RESUMO – O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de infecções e o perfil de resistência aos antimicrobianos de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores (BGNNF) isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia na cidade de Fortaleza. As bactérias foram isoladas em ágar sangue, Cled e caldo BHI, identificadas pelo Bac-tray e o teste de susceptibilidade foi realizado segundo a técnica de Kirby-Bauer. Foram avaliadas 319 amostras. Das amostras estudadas, 30 (9,4%) foram positivas para BGNNF. *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais frequente com 14 (47%) das cepas isoladas, em seguida a *P. putida* com 11 (36%), *Burkholderia cepacea* com três (10%) dos isolados e *P. fluorescens* com dois (7%). A amostra biológica de onde foi isolada um número maior de BGNNF foi a secreção traqueo brônquica com 13 (43,3%) e a urina com 8 (26,7%) dos isolados. O setor do hospital que isolou mais cepas de BGNNF foi a UTI com 14 (47%). Segundo o perfil de susceptibilidade o antimicrobiano mais sensível foi o imipenem.

PALAVRAS-CHAVE – Bacilos Gram negativos não fermentadores, antimicrobianos.

SUMMARY – This study presents the infections frequency and the antimicrobials profile resistance of Nonfermentative Gram Negatives Bacilli (NFGNB) isolated in the Pathology Clinical Laboratory Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia Hospital in Fortaleza. The bacteria were isolated in agar blood, Cled and broth BHI, identified for the Bac-tray method and the susceptibility test was carried through according to Kirby-Bauer technique. It was studied 319 samples: 30 (9.4%) were positive for NFGNB. *P. aeruginosa* was the most frequent with 14 (47%) of strains isolated, *P. putida* 11 (36%), *Burkholderia cepacea* 3 (10%) and *P. fluorescens* with 2 (7%). The biological sample from had been isolated with a bigger number of NFGNB were the bronchial traqueo secretion with 13 (43.3%) and urine with 8 (26.7%). The department which were isolated more strains of NFGNB was the UTI with 14 (47%). According to susceptibilities profile the most sensible antimicrobial were the imipenem.

KEYWORDS – Nonfermentative Gram Negatives Bacilli, antimicrobials.

INTRODUÇÃO

Os bacilos Gram negativos não fermentadores são assim denominados devido ao fato de não utilizarem a glicose e outros açúcares de forma fermentativa. São também algumas das bactérias mais difíceis de serem identificadas laboratorialmente, pois dão resultados negativos em muitos testes convencionais¹⁴.

Neste grupo está incluído o gênero *Pseudomonas* e alguns outros gêneros estreitamente relacionados, que constituem a família atualmente denominada *Pseudomonadaceae*. Os membros dessa família caracterizam-se como bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos; a maioria das cepas apresen-

tam motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utilizam glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo oxidase positivas⁴.

As *Pseudomonas* são microrganismos ubíquos encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. São também encontradas em todo o ambiente hospitalar em reservatórios úmidos, como alimentos, flores cortadas, pias, sanitários, esfregões para piso, equipamento de tratamento respiratório e diálise e até mesmo em soluções desinfetantes. A persistência do estado de portador nos seres humanos é rara como parte da microbiota normal, a não ser que o indivíduo esteja hospitalizado, ou seja, um hospedeiro imunocomprometido ambulatorial. *Pseu-*

Recebido em 18/6/2004
Aprovado em 9/9/2004

* Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da UFC;

² Farmacêutica Bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza

Pseudomonas aeruginosa é o pseudomonádeo mais frequentemente isolado de amostras clínicas. A ampla distribuição ambiental das *Pseudomonas* é assegurada por suas exigências simples para crescimento¹¹.

A gravidade das infecções das vias aéreas inferiores por *P. aeruginosa* pode variar desde uma colonização ou traqueo-bronquite benigna até a ocorrência de broncopneumonia necrosante grave. A colonização é observada em pacientes com fibrose cística, outras doenças pulmonares crônicas ou neutropenia. A infecção pulmonar por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística tem sido associada a exacerbação da doença subjacente, bem como a doença invasiva no parênquima pulmonar. As cepas mucóides estão comumente associadas nestes pacientes, e sua erradicação é difícil com antibioticoterapia. Os pacientes neutropênicos e outros pacientes imunocomprometidos são frequentemente expostos a *Pseudomonas* através de exposição a equipamento de tratamento respiratório contaminado. A doença invasiva nesta população caracteriza-se por broncopneumonia difusa e geralmente bilateral, com formação de microabscessos e necrose tecidual¹¹.

As infecções por *Pseudomonas* são basicamente oportunistas, isto é, restrita a pacientes com comprometimento das defesas do hospedeiro. Isto ilustra a importância da capacidade do hospedeiro de impedir a colonização e invasão por *Pseudomonas*¹¹.

Em todo o mundo é reconhecida a crescente prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos, sobretudo das multirresistentes, que não vêm mostrando, em geral, comprometimento em relação à sua virulência, infectividade ou sobrevida⁹.

Autoridades e organizações científicas internacionais vêm expressando, com frequência e ênfase, suas preocupações com o fenômeno e têm recomendado esforços no sentido de sua melhor caracterização nas diferentes regiões e no correr do tempo. Nesse sentido, estudos longitudinais, que visem obtenção e análise de taxas de resistência dos agentes bacterianos isolados de pacientes, constituem-se em valioso recurso prático para o adequado direcionamento da antibioticoterapia⁹.

De maneira mais comum, a transmissão de bactérias multi-resistentes se dá de maneira cruzada, através dos profissionais de saúde, tanto pelo contato direto entre um paciente e outro, como pelo contato indireto devido ao manuseio de artigos ou superfícies contaminadas. Mais raramente pode ocorrer transmissão por uma fonte única diretamente de artigo ou equipamento contaminado¹⁶.

As cepas de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos não apresentam maior potencial de transmissibilidade ou virulência quando comparadas às cepas sensíveis, entretanto, as infecções devidas a agentes multirresistentes apresentam opção terapêutica restrita¹.

Tendo em vista que as infecções por *Pseudomonas* são uns dos grandes problemas mundiais de saúde pública, e por sua baixa exigência nutricional, podendo ser encontrada no ambiente hospitalar, colonizando equipamentos de terapia respiratória, desinfetantes, pias, água destilada, cateteres venosos centrais, cateter urinário e paciente com poucos dias de internação, e principalmente pela alta frequência de resistência aos antimicrobianos, resolveu-se fa-

zer este estudo no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas, no período de Janeiro de 2002 a Janeiro de 2003, 319 amostras para verificação do perfil da infecção, da frequência e da resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram negativas não fermentadoras, no Laboratório de Patologia Dr. Edilson Gurgel. As amostras foram isoladas de diversos sítios anatômicos, como: sangue, urina, secreções (traqueal, traqueobronquica), ponta de catéter e escara sacral.

As amostras de BGNNF foram isoladas em placas de agar sangue, Agar Cled e caldo BHI, incubadas à 37°C por 24 horas. Após o crescimento da cultura foram realizados a coloração de Gram e o teste da oxidase^{4,5}.

As bactérias Gram negativas não fermentadoras oxidase positivas foram identificadas através do sistema Bac Tray 3⁴, que utiliza as seguintes provas bioquímicas: Cetrimide; Acetamida; Malonato; Citrato; Maltose; Esculina; Controle da Arginina; Urease e Indol.

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados pela técnica de difusão em Ágar pelo método Kirby-Bauer (NLLCC)¹².

Os discos de antimicrobianos utilizados foram do laboratório Oxoid e foram os seguintes: Amicacina, ampicilina, azactam, cefalexina, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipinem, netilmicina, ofloxacina, tetraciclina, tobramicina, sulfazotrim e cefepime.

RESULTADOS

Foram estudados durante o período de janeiro de 2002 a janeiro de 2003, 319 amostras biológicas. Deste total foi observado uma frequência de bactérias Gram negativas não fermentadoras 9,4% (30 casos).

Dentro desse gênero, a espécie isolada predominante foi a *P. aeruginosa*, com 14 cepas (47%) e em seguida foi a *Pseudomonas putida* com 36% de acordo com a Fig. 1.

Na Tab. I foram observados os isolamentos mais frequentes de BGNNF e os vários espécimes clínicos de pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, secreções (56,66%), urina (26,66%), pontas de catéter sangue (6,66%).

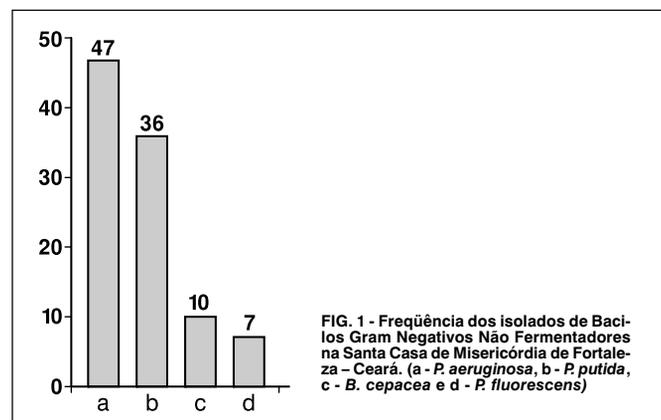
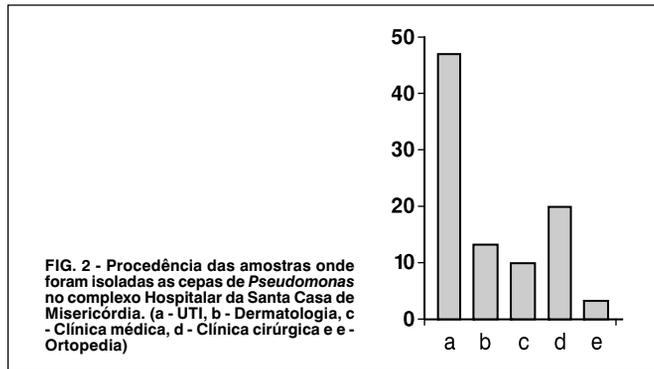


FIG. 1 - Frequência dos isolados de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - Ceará. (a - *P. aeruginosa*, b - *P. putida*, c - *B. cepacea* e d - *P. fluorescens*)



Em relação a procedência das amostras, foram isoladas 14 cepas (47%) provenientes da UTI, 04 cepas (13%) provenientes da dermatologia; 03 cepas (10%) do apoio; 06 cepas (20%) da clínica cirúrgica e uma cepa (3%) da ortopedia, de acordo com a Fig. 2.

A Tab. II mostra o comportamento das 30 amostras de BGNNF aos agentes antimicrobianos, isoladas de pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

Em relação aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, foram verificadas resistência total aos seguintes antibióticos: ampicilina, cefalexina, afalotina, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfazotrim (100% resistentes).

O imipinem foi a droga que apresentou menor frequência de resistência (50% de resistência).

DISCUSSÃO

O bacilo Gram negativo não fermentador é, fundamentalmente, um patógeno oportunista que causa infecções em pacientes hospitalizados, pode causar infecções em qualquer parte do corpo, mas as infecções do trato urinário, pneumonias e infecções em ferimentos, predominam.

Do sítio de infecção, a bactéria pode penetrar na corrente sanguínea, causando septicemia.

Pacientes com septicemia causada por *Pseudomonas aeruginosa* têm taxa de mortalidade acima de 50%⁴.

A frequência de cepas de *Pseudomonas* isoladas no Laboratório de Patologia Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia foi de 9,4%.

Menezes *et al* 2002^{a7}, estudando 1084 culturas isoladas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará observaram uma frequência de 10% de bactérias do gênero *Pseudomonas*. O que condiz com o fato de que a *Pseudomonas*, por ser uma bac-

TABELA I
Distribuição das amostras de BGNNF de acordo com os espécimes clínicos isolados de pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza

Espécimes clínicos	Amostras (30)	
	nº	%
Secreções	4	13,33
Urina	8	26,66
Pontas de catéter	2	6,66
Secreções traqueo-brônquica	13	43,33
Sangue	2	6,66
Escarro sacral	1	3,33

TABELA II
Perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos de cepas de *Pseudomonas* isoladas da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza no período de janeiro de 2002 a janeiro de 2003

Antimicrobiano	Total de amostras				Total
	Sensíveis		Resistentes		
	nº	%	nº	%	
Imipinem	15	(50%)	15	(50%)	30
Netilmicina	7	(23,3%)	23	(76,6%)	30
Amicacina	7	(23,3%)	23	(76,6%)	30
Ampicilina	0	0%	30	(100%)	30
Azactam	4	(13,3%)	26	(86,6%)	30
Cefalexina	0	0%	30	(100%)	30
Afalotina	0	0%	30	(100%)	30
Cefotaxima	0	0%	30	(100%)	30
Cefoxitina	0	0%	30	(100%)	30
Ciprofloxacina	7	(23,3%)	23	(76,6%)	30
Cloranfenicol	0	0%	30	(100%)	30
Gentamicina	5	(16,6%)	25	(83,4%)	30
Tetraciclina	0	0%	30	(100%)	30
Tobramicina	7	(23,3%)	23	(76,6%)	30
Sulfazotrim	0	0%	30	(100%)	30

téria nosocomial e oportunista, é comumente encontrada em infecções hospitalares.

Menezes *et al*, 2002b⁸, estudando culturas de ponta de catéter provenientes do Hospital Geral observaram que a *P. aeruginosa* foi o bacilo Gram negativo não fermentadores mais comumente isolado.

Frota & Moreira, 1998², estudando bacilos Gram negativos não fermentadores no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará observaram uma frequência de 69,95% de *P. aeruginosa*.

Em nosso estudo o isolamento de *P. aeruginosa* correspondeu a 40% dos isolados.

Verificamos que a distribuição das amostras de *P. aeruginosa*, quanto a natureza do material clínico envolvido, mostrou-se similar à encontrada na literatura disponível, ou seja, o isolamento foi mais frequente a partir de secreções, urina e pontas de cateter.

Menezes *et al*, 2002a⁷, encontrou que as amostras biológicas mais comumente fonte de *Pseudomonas* eram urina, sangue, lesão cutânea e escarro espontaneamente.

Quanto à procedência das amostras, observamos que a UTI, foi o setor onde houve maior isolamento de cepas de *Pseudomonas*, com 47%. Em seguida aparecem as clínicas cirúrgicas (com pacientes do Instituto Dr. José Frota, urologia e ginecologia) com 20%, dermatologia com 13,3%, apoio com 10%, Clínica Médica II com 6,6% e Ortopedia com 3,3%.

Menezes *et al*, 2002^{a7}, estudando *Pseudomonas* no Hospital Universitário da UFC, observaram que pacientes da nefrologia, urologia e hemodiálise, foram mais freqüentes os isolamentos de *Pseudomonas*. Verificamos que *Pseudomonas aeruginosa* é o bacilo Gram negativo não fermentador mais freqüentemente isolado de amostras clínicas.

A resistência aos antimicrobianos está normalmente associada a um elemento extracromossômico ou plasmídeo, que pode ser transferido entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. Com o uso indiscriminado de antimicrobianos, tem ocorrido seleção de amostras resistentes e rapidamente haverá toda uma população bacteriana resistente a determinado quimioterápico¹⁵.

Constatamos que o padrão de resistência deste microrganismo é qualitativamente bastante amplo, como fora esperado. Somente 50% dos bacilos Gram negativos não fermentadores mostraram sensibilidade ao Imipenem, no estudo realizado por Menezes *et al*, 2002^{a7} em Fortaleza e por Santos Filho *et al*, 2002¹³, em João Pessoa a sensibilidade encontrada para o Imipenem foi de 73,6% e 80,3% respectivamente.

Fica claro que as cepas estão cada vez mais sendo selecionadas e expressando sua resistência, o que é um fato preocupante, pois em um futuro próximo talvez não tenhamos antimicrobianos capazes de atuar efetivamente contra *Pseudomonas*.

Em relação aos antimicrobianos ativos sobre bactérias Gram negativas que possuem anel betalactâmico, como ampicilina, cefalosporina, observamos 100% de resistência para ampicilina e cefalosporina, comportamento também relatado por outros autores (Santos Filho *et al*, 2002)¹³. A resistência aos antimicrobianos com anel beta – lactâmico é mediada por plasmídeo e causada pela presença de beta – lactamases.

Todas as amostras mostraram-se resistentes à tetraciclina, sulfazotrim, cloranfenicol, não se afastando dos resultados encontrados por Hill *et al*, 1972⁶ e Menezes *et al*, 2002^{a7}.

Em relação aos aminoglicosídeos, verificamos que a amicacina, netilmicina e tobramicina mostraram efeitos similares, o que diverge um pouco dos resultados encontrados por Moreno *et al*, 1976¹⁰, em São Paulo e Pon Klasterky *et al*, 1973³. Em seus trabalhos a amicacina foi o mais efetivo seguido da tobramicina e da gentamicina. 23,3% das cepas de bacilos Gram negativos não fermentadores mostraram-se sensíveis a esses antimicrobianos. Observou-se que a gentamicina mostrou-se a menos efetiva (16,6% das cepas foram sensíveis) frente aos aminoglicosídeos testados.

A ciprofloxacina que é a fluoroquinolona mais comumente utilizada na atualidade, foi utilizada em 30 cepas das quais 23 (76,6%) se mostram resistentes.

O surgimento dessa resistência deve-se ao fato da ciprofloxacina não ser reservada para organismos resistentes a outras drogas.

A presença de numerosas cepas de bacilos Gram negativos não fermentadores multi resistentes neste trabalho, de algum modo é explicado pelo uso abusivo de antimicrobianos em nosso meio, sobretudo com finalidade profilática, contribuindo para um intenso pro-

cesso seletivo de bactérias na população de pacientes hospitalizados.

CONCLUSÃO

- De todas as culturas realizadas no complexo hospitalar da Santa Casa de Misericórdia, 9,4% foram positivas para bacilos Gram negativos não fermentadores.

- A *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais isolada dentro do grupo com 40%.

- Foram isoladas cepas de bacilos Gram negativos não fermentadores principalmente das amostras de secreções e urina.

- A UTI foi o setor de maior procedência das amostras onde se isolaram as cepas de bacilos Gram negativos não fermentadores, seguida da Clínica Cirúrgica (com pacientes do Instituto Dr. José Frota, Urologia e Ginecologia).

- Os antimicrobianos mais potentes observados foram o Imipenem, netilmicina, amicacina, ciprofloxacina e tobramicina.

Os antibióticos menos potentes, foram a ampicilina, cefalexina, cefalotina, cefotaxima, cloranfenicol, tetraciclina e sulfazotrim.

REFERÊNCIAS

1. Benveniste R & Daviea I – Mechanism of antibiotic resistance in bacteria – *Annu Rev Biochem*, 42: 471 – 501, 1973.
2. Frota, C.C.; Moreira, J.L.B. Frequency of nonfermentative Gram-negative bacilli isolated from clinical material of patients at Universidade Federal do Ceará Hospital complex Brazil. *Rev. Microbiol.* 29(5): 25-31.1998.
3. Klasterky J, Daneau D & Maertelaer V – Comparative study 40 tobramycin and gentamicin with special reference to anti-pseudomonas activity. *Clin Pharmacol Therap*, 14 (1): 104-11, 1973.
4. Koneman EW; Allen SD; Janda WM; Schreckekenberger PC; Winn Jr. WC: *Diagnóstico Microbiológico*. 5ª edição, 2001.
5. Henry, J.B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais*. 19ª edição.1200p. 1998.
6. Hill J.J, Guzman AL, Lopez AL, Beraud BV & Escarzagua E – Tipificación piocínica y susceptibilidad a los antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* de tres hospitales de la ciudad de México. *Rev lat Amer. Microbiología*, 14: 127 – 135, 1972.
7. Menezes, E. A.; Ferreira, F.C.; Cunha, F. A.; Café, V. S.; Moreira, J.L.B. Cepas de *pseudomonas* resistentes a antimicrobianos testados no complexo hospitalar da Universidade federal do Ceará. *RBAC*. 34(1):27-30.2002.
8. Menezes, E. A.; Favali, C.B.F.; Cunha, F. A.; Salviano, M.N.C.; Ângelo, M.R.F. Caracterização bacteriana em culturas de ponta de catéter. *RBAC*. 34(3):151-154.2002.
9. Montelli, A C. Caracterização da Sensibilidade Bacteriana aos Antimicrobianos no Brasil, 1980-1987. *Rev. Bras. Patologia Clin.*; 24(3) 78-82, jul/set 1988.
10. Moreno G. Gomes M.G.G Lopes CAM – Atividade in vitro da tobramicina, gentamicina e carbenicilina. *Botucatu Cient. séc B*, 20: 23-28, 1976.
11. Murray, P.R; Drew, W.L; Kobayashi, G.S.; Thompson Jr., J.H. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro – RJ. Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.
12. National Committes for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria (approved standard M2 – A4). Villanova PA. NCCLS, 1985.
13. Santos Filho, L.; Santos, I.B.; Assis., A.M.L.; Xavier, D.E. determinação da produção de metalo-betalactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa na Paraíba. *J. Bras Patologia*. 38: 291-96.2002.
14. Silva, C.H.P.M. *Bacteriologia um texto ilustrado*. Editora Eventus, Rio de Janeiro, 1ª. Edição, 1999; 531p.
15. Tavares, W. *Manual de Antibióticos, Quimioterápicos e Antiinfeciosos*. Editora Ateneu, 2002.
16. Whitby JL & Ramling A - *Pseudomonas aeruginosa* contamination in domestic and hospital environments. *Lancet*, 1:15-17, 1972.

Endereço para correspondência
Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes
Rua Frei Manmeto, 150/501 - 60175-070
Fortaleza - Ceará

Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas

Different doses of the flavonoid rutin on the levels of serum lipids in male and female rabbits

Oliveira, T.T.¹; Nagem, T.J.²; Lopes, R.M.¹; Moraes, G.H.K.¹; Ferreira Junior, D.B.¹; Silva, R.R.¹ & Maia, J.R.S.³

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses do flavonóide rutina sobre os níveis de lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas da raça Nova Zelândia, com 55 dias de vida. De acordo com os resultados, o colesterol não diferiu estatisticamente nos machos, mas apresentou reduções significativas para as fêmeas. Com relação ao colesterol-HDL, as fêmeas não apresentaram alterações e machos apresentaram reduções no grupo tratado 20mg/dia de rutina. Para triacilgliceróis, observou-se diferenças significativas nos grupos tratados com 60mg/dia de rutina.

PALAVRAS-CHAVE – Rutina, lipídeos, coelhos.

SUMMARY – The present work evaluates the effect of different doses of the flavonoid rutin on the levels of serum lipids in male and female rabbits from New Zealand race with 55 days of life. The results showed that cholesterol was not statistical different for male animals. Otherwise, females rabbits showed significant reductions. For cholesterol-HDL, female rabbits did not showed alterations but males rabbits presented reductions mainly in the group treated with 20mg/daily of rutin. For triacilglycerols, the statistical significant differences was observed in the groups treated with 60mg/daily of rutin.

KEYWORDS – Rutin, lipids, rabbits.

INTRODUÇÃO

As lipoproteínas (LP) são aglomerações moleculares quase esféricas e constituídas de componentes hidrofóbicos em seu interior (colesterol esterificado, triacilgliceróis, vitaminas lipossolúveis) e componentes mais hidrofílicos na periferia (fosfolipídeos, colesterol não-esterificado). As apolipoproteínas (apo-LP), formam um mosaico externo com segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos que permitem a solubilidade do macroagregado em meio aquoso, e desempenham diversas funções na regulação de enzimas e de proteínas que participam do metabolismo das lipoproteínas (Quintão e Nakandakare, 1992).

A aterosclerose é uma cardiopatia coronária que tem como fatores de risco a idade, sexo, obesidade, stress emocional, baixos níveis de colesterol-HDL, fumo, dietas ricas em gordura saturada e ainda predisposição genética. Estes são correlacionados com o aumento nos níveis sanguíneos de colesterol, assim como atividades oxidantes de radicais livres sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ao nível endotelial. O consumo de gorduras saturadas aumenta os valores do colesterol na corrente sanguínea, impedindo a atividade dos receptores de LDL e, conseqüentemente, dificultando a sua eliminação (Leite, 1994).

Os altos níveis de colesterol-HDL reduzem os níveis de cardiopatia coronária; seu efeito é oposto ao colesterol-LDL. Indivíduos que apresentam altos níveis séricos de LDL e níveis baixos de HDL, apresentam riscos elevados de cardiopatia coronária. Ainda que os níveis de HDL possam estar condicionados geneticamente, a alimentação é um dos fatores determinantes.

Nos países desenvolvidos, os altos níveis sanguíneos de colesterol devem-se principalmente a uma alimentação inadequada (Feinleb, 1984).

Flavonóides são compostos naturais encontrados, usualmente, em verduras, leguminosas, frutas, grãos, sementes, ervas e também em bebidas como vinho e chá (Peterson e Dwyer, 1998).

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* têm mostrado a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo Ratty e Das (1998) algumas delas já foram observadas por Szent-Gyorgi, desde 1936. Os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos, já foram observados: capacidade antioxidativa, antiinflamatória, vasodilatadora, antialérgica, antihepatotóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária, antimicrobianas, antivirais, bem como atividade contra o desenvolvimento de tumores (Kuhlmann *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1993; Hanasaki *et al.*, 1994). Todavia, Formica e Regelson (1995) afirmam que, apesar desses compostos poderem desempenhar atividades mutagênicas, os mesmos são considerados como substâncias essencialmente não carcinogênicas.

Izzo *et al.* (1994) verificaram a proteção exercida pela quercetina, kaempferol e rutina sobre a mucosa gástrica de ratos contra a atividade ulcerogênica de etanol. Os autores sugerem que a redução de um fosfolipídio endógeno denominado fator de agregação plaquetária (platelet - activating factor PAF), causador de ulcerações gastrointestinais, é uma das principais razões da atividade contra processos de ulcerações nas mucosas gástricas. Associando a mesma com a capacidade de promover a diminuição de secreção de ácidos gástricos e aumento da secreção de glicoproteínas, bi-

Recebido em 19/11/2003

Aprovado em 5/4/2004

¹Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil; ²Deptº de Química, UFOP, 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil;

³Departamento de Química, UFV, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.

carbonato de sódio, da microcirculação vascular e da síntese de prostaglandinas, notadamente as PGI2 e PGE2 que apresentam capacidade citoprotetora da mucosa gástrica (Borel *et. al.*, 1987).

Pelzer *et. al.* (1998) por sua vez, estudaram o efeito antiinflamatório de 30 flavonóides, dentre eles, a rutina e jaceosidina que inibiram significativamente o edema provocado pelo processo de inflamação induzido nas patas de ratos e foram os que apresentaram os melhores efeitos antiinflamatórios.

Morel *et. al.* (1993) também observaram que a rutina e a quercetina foram os inibidores mais efetivos no sistema de peroxidação lipídica dependente de ferro e foram quelantes dos íons ferro com formação de complexos inertes incapazes de iniciar a peroxidação lipídica. Demonstraram capacidade de suprimir os estágios do processo de formação dos radicais livres como a formação do radical hidroxila na reação de Fenton e a formação de radical peróxido.

Outros estudos mostram que os flavonóides quercetina, rutina e naringina inibem a biossíntese de eicosanóides (resposta antiprostanoide e antiinflamatória), protegem a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (previnem formação de placa aterosclerótica), previnem agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos), e promovem relaxamento de músculo liso (efeito antihipertensivo e antiarrítmico). Além disso, flavonóides têm também apresentado propriedades antivirais e carcinostáticas (Smith *et. al.*, 1993).

O efeito antioxidante dos flavonóides parece estar relacionado com sua ação antitrombótica. A ação antitrombótica e vasoprotetora de quercetina e rutina, além de outros flavonóides, tem sido atribuída à sua habilidade de ligar-se à membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Através de sua ação antioxidante, os flavonóides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (Cook e Samman, 1996).

Devido a grande importância da rutina e de suas propriedades biológicas, o presente trabalho foi elaborado com a finalidade de avaliar o efeito de diferentes doses da rutina sobre ganho de peso e sobre os níveis de lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas da raça Nova Zelândia com 55 dias de idade.

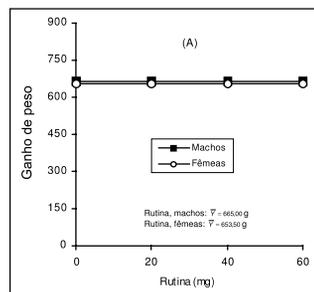


FIG. 1 - Estimativa do ganho de peso de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina.

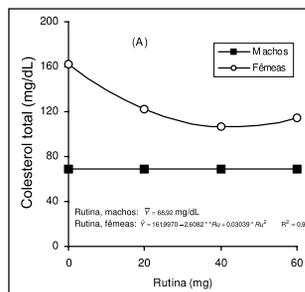


FIG. 2 - Estimativa do colesterol total de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses diferentes de rutina.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia provenientes do setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa com 55 dias de idade no início do experimento. Os animais foram divididos em machos e fêmeas, constituindo-se 4 grupos por sexo, contendo cada um 5 animais, que receberam rutina nas doses de 20, 40 e 60mg, além dos grupos controles que receberam apenas ração. Os animais foram colocados em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, sendo que a taxa de umidade relativa do ar foi mantida em torno de 70%. O regime alimentar constituiu-se de água potável *ad libitum* e ração comercial "Socil", sendo fornecida uma quantidade de 120g/dia por animal. Após um período de adaptação de sete dias, os animais receberam, diariamente, durante 28 dias, uma cápsula contendo rutina com suas respectivas doses. Foram estipulados dois tempos para a coleta de sangue e pesagem dos animais: o tempo 0 (zero) aquele após o período de adaptação e tempo final após o 28º dia. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo venoso retro-orbital, sendo, a seguir, centrifugadas a 3500xg durante 15 minutos e efetuadas as dosagens sorológicas de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis em equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados na Tab. I e representados nas Figuras 1, 2, 3 e 4. A discussão dos gráficos foi feita para cada parâmetro avaliado nos tempos 0 (zero) e final do período experimental, ou seja, após 28 dias.

A discussão dos gráficos fundamenta-se sobre equa-

TABELA I
Ganho de peso, colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis de machos e fêmeas de coelhos tratados com diferentes doses de rutina

Grupos	Tempo (Dias)	Ganho de peso (g)		Colesterol (mg/dL)		Colesterol-HDL (mg/dL)		Triacilgliceróis (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0			72,94 Ba	156,58 Aa	35,64 Aa	43,40 Aa	134,40 Aa	152,80 Aa
	28	660,00 A	670,00 A	71,04 Ba	164,98 Aa	33,76 Ba	44,28 Aa	134,44 Aa	152,00 Aa
Ração + 20 mg de rutina	0			72,00 Ba	166,00 Aa	37,06 Aa	40,96 Aa	142,00 Aa	149,02 Aa
	28	683,00 A	670,00 A	64,78 Ba	113,04 Ab	26,06 Ab	34,18 Aa	119,66 Aa	120,56 Aa
Ração + 40 mg de rutina	0			72,04 Ba	152,00 Aa	35,56 Aa	37,44 Aa	134,80 Aa	150,00 Aa
	28	683,00 A	642,00 A	73,44 Ba	115,24 Ab	33,25 Aa	37,40 Aa	145,62 Aa	119,44 Aa
Ração + 60 mg de rutina	0			70,02 Ba	161,20 Aa	35,98 Aa	33,72 Aa	116,98 Ba	154,00 Aa
	28	634,00 A	632,00 A	66,42 Ba	111,92 Ab	38,40 Aa	38,42 Aa	135,16 Aa	99,60 Bb

Em cada característica, cada grupo e cada tempo (linha), A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F ($P < 0,05$).

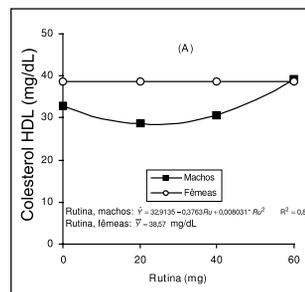


FIG. 3 - Estimativa do colesterol HDL de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses diferentes de rutina.

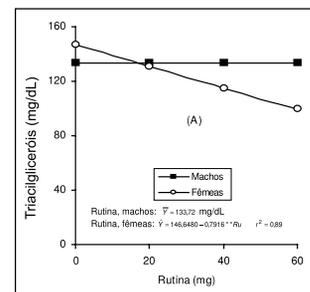


FIG. 4 - Estimativa de triacilgliceróis de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses diferentes de rutina.

ções ajustadas para o tratamento de rotina, aos animais machos e fêmeas, após os tratamentos. Por meio destas equações utilizadas para a montagem dos gráficos, pode-se calcular as maiores e menores médias estimadas dos parâmetros avaliados de acordo com a dose utilizada.

Fatores como a linhagem, a idade, a alimentação e o sexo dos animais, assim como as condições ambientais e as variáveis analíticas influenciam no resultado final de estudos bioquímicos, daí a importância de se considerar os valores encontrados nos grupos controle dentro deste experimento. Também a variação no procedimento das técnicas utilizadas para coleta e preparo das amostras pode influenciar no resultado final.

A Tab. I indica que o ganho de peso entre os grupos formados não apresentou variações estatisticamente significativas ($P > 0,05$), o que permite concluir que os tratamentos não afetaram o ganho de peso dos animais. Esta conclusão é confirmada na Figura 1, onde se pode verificar que o uso da rotina não interferiu no parâmetro analisado, já que todos os animais mantiveram as mesmas estimativas, apresentando, para os machos uma média de ganho de peso de 665,00 gramas, e para as fêmeas a média de 653,00 gramas.

Uma diferença significativa ($P < 0,05$) foi observada para o colesterol total em todos os grupos e tempos de fêmeas, enquanto que para os machos, não. Níveis séricos de colesterol foram maiores em fêmeas (Tab. I).

É importante salientar que os coelhos estavam entrando em puberdade e, por isso, o colesterol sintetizado tem várias rotas metabólicas a seguir, sendo as principais a síntese dos sais biliares e a dos hormônios esteroidais.

No caso de coelhas que possuem quatro ou cinco glândulas mamárias distribuídas aos pares, as situadas na região abdominal são as mais produtivas, e apresentam o ápice de seu desenvolvimento após a puberdade, devido à ação dos hormônios estrógenos e da progesterona (15). Parte do colesterol é empregado nestas produções de hormônio, motivo pelo qual se justifica o maior valor de colesterol nas fêmeas em comparação com os machos.

Os resultados mostraram que o colesterol foi reduzido em todos os grupos de fêmeas tratados, evidenciando-se uma capacidade hipocolesterolêmica de rotina nas doses empregadas, embora nos machos não tenha sido observado o mesmo desempenho. A redução dos níveis do colesterol em coelhas se torna mais relevante ao se observar, que não ocorreram variações estatisticamente significativas do colesterol-HDL. Isto é uma vantagem, pois o colesterol-HDL retira o colesterol da circulação e o leva para o fígado para ser metabolizado.

A Fig. 2 mostra que os coelhos machos não variaram seus valores médios de colesterol total de 68,92mg/dL em todas as doses de rotina empregadas. Já as fêmeas apresentaram um valor maior 162,00mg/dL. Estima-se que a rotina, se aplicada durante 28 dias numa dose de 42,91mg acarretaria, uma menor estimativa de colesterol, numa concentração média de 106,04mg/dL.

Com relação aos níveis de colesterol-HDL, as fêmeas não apresentaram alterações significativas quando comparados os tempos 0 e 28 dias. Já os coelhos machos apresentaram reduções estatisticamente significativas no grupo tratado com rotina 20mg por dia (Tab. I).

A análise da Fig. 3 evidencia que rotina não atuou influenciando o colesterol - HDL em fêmeas que manteve uma média de 38,57mg/dL. Nos machos, uma dose de 60 mg de rotina elevou o colesterol - HDL para uma média

máxima de 39,25mg/dL. Estima-se que uma dose de 23,43mg reduziria o HDL para um nível de 28,51mg/dL.

Para triacilgliceróis se observou diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), comparando sexos distintos, nos grupos de animais tratados com rotina na dose de 60mg diárias. É importante ressaltar que a rotina diminuiu os níveis de triacilgliceróis em fêmeas de 154,00 para 99,60mg/dL ao final do experimento (Tab. I).

A atividade desta substância torna-se bem visível quando se observa que o grupo controle apresenta valores médios de 146,65mg/dL.

Para os machos tratados com rotina, os níveis séricos de triacilgliceróis apresentaram uma manutenção em suas médias ao longo das doses do tratamento efetuado. O valor médio de 132,72mg/dL foi constante (Fig. 4).

CONCLUSÃO

O flavonóide rutina, nas condições experimentais deste trabalho, mostrou-se eficaz em reduzir, de maneira significativa, os níveis de colesterol total em fêmeas de coelhos, mas não nos machos. Não influenciou nos níveis de colesterol-HDL nos machos e fêmeas, à exceção da dose de 20mg nos machos.

Os teores de triacilgliceróis foram reduzidos significativamente nas fêmeas somente na dose de 60mg diários de rotina. Estes resultados podem servir de parâmetros, na utilização da rotina com fins hipolipidêmicos, devido especialmente, a sua capacidade de diminuir o colesterol total, o grande vilão das doenças cardiovasculares dos tempos modernos.

REFERÊNCIAS

1. Borel, J.P.; Maquart, F.X.; Valeyre J.; Peuch, L.C.; Rondouse, A.; Bioquímica Dinâmica. 1ª ed., Ed. Panamericana, 800p., 1987.
2. Cook, N.C.; Samman, S.; Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources - review. The Journal of Nutrition Biochemistry; 7: 66-76, 1996.
3. Duarte, J.; Vizcaino, F.P.; Utrilla, P.; Jimenez, J.; Tamargo, J.; Zarzuelo, A.; Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. Biochemical Pharmacology; 24: 857-862, 1993.
4. Feinleb, M.; The magnitude and nature of the decrease in coronary artery disease mortality rate. American Journal of Cardiology; 54: 2c-6c, 1984.
5. Formica, J.V.; Regelson, W.; Review of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem. Toxic.; 33: 12, 1061-1080, 1995.
6. Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S.; The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radical Biol. Med.; 16: 845-850, 1994.
7. Izzo, A.A.; Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Capasso, F.; Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. Phytoterapy Research. 8: 179-181, 1994.
8. Kuhlmann, M.K.; Korsch, E.; Burkhardt, G.; Wagner, M.; Kohler, H.; Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cell by the bioflavonoid quercetin. Arch Toxicol; 72: 8, 536-540, 1998.
9. Leite, P.F.; Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. 1ª ed., Editora Acta Médica Ltda, 1994, 175p.
10. Mello, H.V.; Silva, J.F.; A criação de coelhos. 2ª ed.; Editora Globo, 214p., 1989
11. Morel, I.; Lescoat, G. Cogrel, P.; Sergent, O.; Pasdeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; Cillard, P.; Cillard, J.; Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron loaded rat hepatocyte cultures. Biochemical Pharmacology; 45: 13-19, 1993.
12. Pelzer, L.E.; Guardia, T.; Juarez, A.O.; Guerreiro, E.; Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. Il farmaco, 53: 421-424, 1998.
13. Peterson, J.; Dwyer, J.; Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition Research; 18: 12, 1995-2018, 1998.
14. Quintão, E.; Nakandare, E.R.; Manual de referência em dislipidemias; São Paulo, 106p., 1992.
15. Ratty, A.K.; Das, P.N.; Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. Biochemical Medicine and Metabolic Biology; 39: 69-79, 1988.
16. Smith, R.M.; Tiesinga, J.J.; Shah, N.; Smith, J.A.; Jarett, L.; Genistein inhibits insulin-stimulated glucose transport and decreases immunocytochemical labeling of GLUT 4 carboxyl-terminus without affecting translocation of GLUT-4 in isolated rat adipocytes: additional evidence of GLUT-4 activation by insulin. Archives of Biochemistry and Biophysics; 300: 238-246, 1993.

Endereço para correspondência

Profª Drª Tânia Toledo de Oliveira / e-mail: ttoledo@ufv.br
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular
Avenida PH Rolfs, S/N, 36571-000
Universidade de Viçosa - Viçosa - Minas Gerais - Brasil

Mecanismo de interferência do ácido ascórbico em ensaios bioquímicos baseados no sistema oxidase/peroxidase (reação de Trinder)*

Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests using peroxide and peroxidase to generate chromophore (Trinder's reaction)

Flávia Martinello¹ & Edson Luiz da Silva²

RESUMO – Para esclarecer o mecanismo da interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder estudamos as cinéticas de formação e de redução dos cromógenos oxidados, resultantes da reação entre o H_2O_2 , o composto fenólico e a 4-aminofenazona nos ensaios de ácido úrico, colesterol, triglicérides e glicose. Verificamos, também, o efeito dos constituintes da reação de Trinder na interferência pelo ácido ascórbico. O ácido ascórbico inibiu todas as reações estudadas, seguindo uma estequiometria de 1:1 com os analitos. O ácido ascórbico diminuiu a quantidade do cromógeno formado na reação do ácido úrico sem alterar a cinética de formação, enquanto que para o colesterol, triglicérides e glicose houve aumento da fase "lag". No entanto, o ácido ascórbico não inibiu a enzima oxidase. A adição de H_2O_2 aos reagentes não apresentou fase "lag" na presença de ácido ascórbico. Dentre os componentes da reação de Trinder somente o H_2O_2 reverteu a inibição pelo ácido ascórbico. Além disso, o ácido ascórbico não reduziu expressivamente os cromógenos formados. Concluímos que o consumo do H_2O_2 foi o mecanismo predominante da interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder. O efeito na cinética de formação dos cromógenos deve-se, possivelmente, à velocidade de geração do H_2O_2 pelas oxidases específicas.

PALAVRAS-CHAVE – Ácido ascórbico, reação de Trinder, ensaios bioquímicos, interferência analítica.

SUMMARY – It is well known that ascorbic acid interferes negatively in peroxidase-based tests (Trinder's reaction). To determinate the chemical mechanism of this interference, it was verified the effects of ascorbic acid in the kinetic production and reduction in the oxidized chromophore, which is yielded by the H_2O_2 , peroxidase reaction, phenolic compound and 4-aminofenazone in urate, total cholesterol, triglycerides and glucose tests. Furthermore were examined the effects of the Trinder's reaction components on the interference by ascorbic acid. Ascorbic acid interfered stoichiometrically with all tests studied. In urate test the ascorbic acid decreases the chromophore formation but did not affect the kinetic reaction. In contrast, with cholesterol, triglycerides and glucose tests there was an increase in the lag time of color development and the consequent negative interference. Ascorbic acid also interfered when H_2O_2 was added to the incubation system, however no lag time occurred. Among the Trinder's reaction compounds only H_2O_2 reverted the inhibition by ascorbic acid and did not reduce the chromophore produced. In summary, it is suggested that H_2O_2 depletion was the predominant chemical mechanism of ascorbic acid interference in the Trinder's reaction. The effect on the kinetics reaction might be due to the rate of H_2O_2 production by oxidases.

KEYWORDS – Ascorbic acid interference, Trinder's reaction, analytical error.

INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico interfere em muitos ensaios laboratoriais, principalmente naqueles que utilizam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a peroxidase para gerar um cromóforo^{1,8,12,18,21}. Demonstramos, recentemente, que a ingestão de 1g de vitamina C por dia, durante uma semana, provocou interferência negativa significativa na quantificação de ácido úrico e bilirrubina, em amostras de soro coletadas até 12h após a ingestão^{11,14}. A interferência nos níveis de bilirrubina foi biológica, enquanto que a interferência para o ácido úrico foi exclusivamente analítica. No entanto, não foram observadas alterações nos valores de glicose, colesterol e triglicérides, inclusive com a maior dose de vitamina C analisada (4g/d)^{11,14}. A interferência nessas reações só aconteceu com a adição de altas concentrações de ácido ascórbico *in vitro*. Demonstramos, ainda, que a di-

ferença no grau de interferência nos diferentes analitos esteve associada à quantidade dos mesmos na amostra¹¹. No entanto, os mecanismos de interferência pelo ácido ascórbico não foram investigados.

Vários analitos bioquímicos podem ser determinados utilizando-se oxidases específicas que produzem o H_2O_2 , cuja quantidade é proporcional à concentração do analito a ser quantificado. Na presença de peroxidase, o H_2O_2 resultante oxida compostos que não absorvem luz na região visível do espectro eletromagnético em compostos coloridos, isto é, gera um cromógeno. Assim, a intensidade de cor formada é diretamente proporcional à concentração do substrato inicial. Nos métodos usuais para a determinação de glicose, ácido úrico, colesterol e triglicérides, o H_2O_2 oxida a 4-aminofenazona (4-AF), a qual combina-se com um composto fenólico para formar uma quinonaína colorida, com alto coeficiente de absorvidade em 500-520nm

Recebido em 22/12/2003
Aprovado em 5/4/2004

*Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis, SC

¹Mestre em Farmácia - Área de Concentração Análises Clínicas - UFSC. ²Professor Adjunto de Bioquímica Clínica

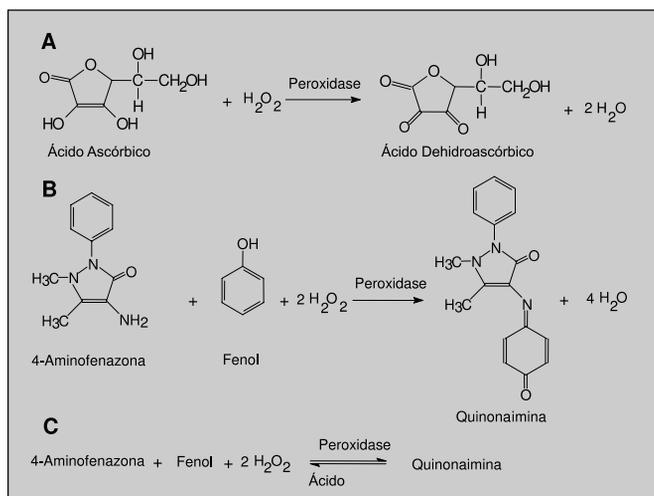


FIG. 1 - Possíveis mecanismos de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder. A) Oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido, podendo consumir o peróxido necessário para oxidar o cromóforo; B) O ácido ascórbico pode interferir diretamente com os constituintes da reação de Trinder, formando um novo composto e/ou consumindo os constituintes; C) O ácido ascórbico pode, ainda, afetar a estabilidade do cromógeno, reduzindo a quinonaimina formada.

(Fig. 1). Esse método, largamente utilizado em bioquímica clínica, foi inicialmente descrito por Trinder, em 1969¹⁵.

O mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder, utilizando a 4-AF e os compostos fenólicos, não está totalmente esclarecido. Tem sido sugerido que a interferência envolve a oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido/peroxidase, consumindo, assim, o H₂O₂ necessário para produzir o cromógeno colorido (Fig. 1A). Alguns autores especulam, ainda, que o ácido ascórbico pode reagir com os outros constituintes da reação de Trinder, como os compostos fenólicos ou a 4-AF, interferindo, assim, na formação do cromógeno colorido ou formando um composto de absorvidade diferente do cromógeno (Fig. 1B)^{3,4,13}. Além disso, o ácido ascórbico pode afetar a estabilidade do cromógeno colorido, ou seja, reduzindo a quinonaimina formada (Fig. 1C)³.

O ácido ascórbico poderia, também, interferir na reação das oxidases. Entretanto, esse mecanismo parece pouco provável por causa do potencial elétrico de oxidação-redução da maioria das flavoproteínas permanecer abaixo do potencial do dehidroascorbato/ácido ascórbico (0,08V em pH 6,4)¹⁶. Outra possibilidade de interferência seria pela produção de radicais livres a partir da oxidação espontânea do ácido ascórbico em solução gerando o ânion radical superóxido⁶, ou pela reação entre a peroxidase/H₂O₂ (composto I) e o ácido ascórbico, formando o "composto II" e o radical ascorbila²⁰. O radical superóxido pode dismutar o peróxido de hidrogênio, via reação de Haber-Weiss, em oxigênio e água⁵ e o radical ascorbila pode oxidar certos cromógenos⁷. No entanto, esse mecanismo é de difícil demonstração, além da baixa reatividade do radical ascorbila¹⁹.

Assim, até o momento não se sabe quais dos possíveis mecanismos de interferência do ácido ascórbico predominam na reação de Trinder utilizando a 4-AF e os compostos fenólicos. O entendimento desse mecanismo favorece a introdução de medidas adequadas para eliminar, ou minimizar, a interferência pelo ácido ascórbico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer os principais mecanismos de interferência do ácido ascórbico nas reações baseadas no sistema oxidase/

peroxidase utilizadas para a determinação de ácido úrico, glicose, colesterol e triglicérides e explicar as razões pelas quais o ácido úrico é mais suscetível à interferência pelo ácido ascórbico.

MATERIAIS E MÉTODOS

• Reagentes e ensaios de inibição do ácido ascórbico em soro humano

O ácido ascórbico foi obtido da Reagen (Rio de Janeiro). O peróxido de hidrogênio foi obtido da Nuclear (São Paulo). A peroxidase tipo II (EC 1.11.1.7), a 4-aminofenazona (4-AF), o fenol, o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno-sulfonato (DHBS) e o tampão HEPES foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis - EUA). Os demais reagentes foram obtidos de outras marcas nacionais.

O pool de soro humano foi preparado a partir de amostras não ictericas e não hemolisadas provenientes do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário - UFSC. Foram utilizados os "kits" de reagentes para ensaios laboratoriais baseados no sistema de reação de oxidase/peroxidase, gentilmente fornecidos pelos laboratórios Bioclin (Belo Horizonte, MG), Biodiagnóstica (Pinhais, PR), BioSystems (Barcelona, Espanha), Celm (Barueri, SP) e Labtest (Lagoa Santa, MG). Os ensaios para a determinação de ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico, foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. Foi utilizado o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8452A Diode Array (EUA) para o monitoramento das leituras de absorvância (cinética) em 510nm, a 37°C, por 10-15 min e para a obtenção dos espectros de absorvância das reações.

• Interferência do ácido ascórbico na formação do cromógeno

O peróxido de hidrogênio foi adicionado aos reagentes de trabalho de ácido úrico, colesterol total, triglicérides e glicose, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico. As cinéticas das reações foram monitoradas em 505nm, a 37°C. Todos os reagentes contêm a 4-AF e um dos seguintes compostos fenólicos: DHBS (ácido úrico), fenol (colesterol e glicose) e clorofenol (triglicérides).

As cinéticas das reações envolvendo também a primeira fase da reação de Trinder (geração de H₂O₂ a partir da ação das oxidases específicas sobre os substratos) foram monitoradas após a adição de soro humano aos reagentes, na ausência e na presença de ácido ascórbico.

• Efeito do ácido ascórbico na atividade da enzima glicose-oxidase

A inibição das enzimas oxidases pelo ácido ascórbico foi verificada através da quantificação do consumo (oxidação) da glicose catalisada pela glicose oxidase. Soro humano (20µl), contendo 500mg/dl de glicose previamente adicionada, foi incubado com 1ml do reagente de trabalho para o ensaio da glicose (Labtest), o qual contém 8000 U/l de glicose oxidase, na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico (relação molar ácido ascórbico: glicose 0,75), a 37°C. Alíquotas de 100µl do sistema de incubação foram retiradas em vários períodos de tempo, durante 15 min, e a quantidade re-

sidual de glicose foi determinada utilizando-se o método da hexoquinase UV (Labtest), o qual não sofre interferência pelo ácido ascórbico. Para descontar a pequena absorvância em 340nm resultante da quinonámina formada foi utilizado um branco para cada amostra (100µl de alíquota em 1ml de água deionizada).

• Reação do ácido ascórbico com os constituintes da reação de Trinder

Para verificar o efeito dos demais constituintes da reação de Trinder, além da oxidase, na interferência causada pelo ácido ascórbico, foram preparados sistemas de reação em tampão fosfato 100mM, pH 7,0 com diferentes concentrações de fenol (2-100mM), DHBS (1-25mM), 4-AF (0,1-5,0mM), peroxidase (500-10.000U/l) e peróxido de hidrogênio (6-24µM com DHBS ou 60-240µM com fenol), na presença e na ausência (controle) de ácido ascórbico. As leituras de absorvância foram realizadas em 505nm, após 10 min de incubação a 37°C, e o percentual de interferência foi calculado em relação ao controle contendo fenol ou DHBS 2,0mM, 4-AF 1,0mM, peroxidase 1000U/l e H₂O₂ 12µM com DHBS ou 120µM com fenol.

• Redução do cromógeno colorido formado

Os reagentes para ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides foram incubados por 10-15min a 37°C na presença de peróxido de hidrogênio ou soro humano. Após a formação do cromógeno, diferentes concentrações de ácido ascórbico foram adicionadas e a cinética de redução do cromógeno foi verificada em 505nm, nos 15 min seguintes.

RESULTADOS

• Efeito do ácido ascórbico nos ensaios bioquímicos baseados no sistema oxidase/peroxidase

Quantidades crescentes de ácido ascórbico foram adicionadas ao "pool" de soro para determinar o seu efeito nos ensaios para ácido úrico, colesterol, glicose e triglicérides baseados no sistema oxidase/peroxidase. Todos os reagentes contêm em suas formulações a 4-AF e um dos seguintes compostos fenólicos: DHBS (ácido úrico), fenol (glicose e colesterol) ou clorofenol (triglicérides). A reação de glicose pelo método da hexoquinase (UV), a qual não é baseada no sistema oxidase/peroxidase, foi usada como controle. O ácido ascórbico interferiu negativamente em todos os ensaios

TABELA I
Efeito *in vitro* do ácido ascórbico na determinação de analitos bioquímicos séricos (mg/dl)

Analitos	Ácido Ascórbico (mg/dl)								
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	5,0	10,0	40,0
Ácido Úrico (T)	3,7±0,08	2,9±0,9	2,6±0,7	2,2±0,5	1,7±0,4	1,2±0,2	0,6±0,04	0,4±0,01	0,04±0,003
Colesterol (T)	140±6,5	138±10,2	136±15,9	132±11,6	127±22,1	126±19,3	123±18,5	111±24,1	42±8,3
Glicose (T)	93±3,8	93±3,5	93±3,6	93±3,5	91±4,8	90±5,4	82±4,1	78±6,5	42±3,4
Glicose (HK)	82±1,9	93±2,7	94±4,4
Triglicérides (T)	100±4,2	92±10,2	90±11,5	87±11,8	80±19,8	76±21,3	67±15,9	40±8,7	2,3±0,03

Os ensaios foram realizados utilizando-se reagentes da Bioclin, Biodiagnóstica, Bio-Systems, Celm e Labtest antes (controle) e após a adição de várias concentrações de ácido ascórbico ao soro. Os resultados obtidos com os diferentes reagentes foram combinados e estão expressos como média ± desvio-padrão de 2-3 experimentos com cada reagente. T, reação de Trinder. HK, método da hexoquinase (ultravioleta).

que utilizam a reação de Trinder, diretamente proporcional à concentração de ácido ascórbico na amostra. A reação de glicose pelo método da hexoquinase (UV) não sofreu interferência. A inibição da reação do ácido úrico pelo ácido ascórbico foi superior à inibição da reação da glicose, do colesterol e dos triglicérides (Tab. I). No entanto, a interferência do ácido ascórbico em todas as reações seguiu uma estequiometria de 1:1, como pode ser observado na Fig. 2. Uma relação molar ácido ascórbico: analito de 0,5:1 resultou em aproximadamente 50% de interferência negativa.

• Efeito do ácido ascórbico no espectro de absorvância da reação de Trinder

Os espectros de absorvância das reações de ácido úrico, colesterol, glicose e triglicérides demonstram que o ácido ascórbico interferiu na formação do cromógeno oxidado com absorvância máxima em 500-520nm, sem formar subprodutos com outras absorvâncias. Na Fig. 3 estão demonstrados os espectros de absorvância com o reagente de ácido úrico na ausência e na presença de H₂O₂ ou H₂O₂ e ácido ascórbico. Na ausência de H₂O₂ o reagente de ácido úrico não demonstrou absorvância na região do visível. Quando soro humano ou H₂O₂ foram adicionados ao reagente, um espectro de absorvância máxima em 500-520nm apareceu rapidamente (menos de 5 min). Quando o ácido ascórbico foi adicionado antes do soro ou do H₂O₂, houve uma nítida interferência na formação do cromógeno com redução no espectro de absorvância máxima (Fig. 3). Resultados semelhantes foram obtidos com os reagentes para colesterol total, glicose e triglicérides (não mostrados).

• Efeito do ácido ascórbico na cinética de formação do cromógeno com H₂O₂

Verificamos, em seguida, o efeito do ácido ascórbico na cinética de formação do cromógeno oxidado com absorvância máxima em 505nm, proveniente da reação do peróxido de hidro-

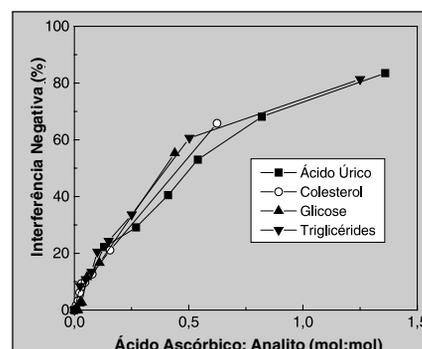


FIG. 2 - Efeito do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas baseadas no sistema de reação oxidase/peroxidase. Os resultados foram obtidos a partir dos valores da Tab. I, normalizados em termos molares ácido ascórbico:analitos e expressos como percentual de interferência negativa do controle (ausência de ácido ascórbico).

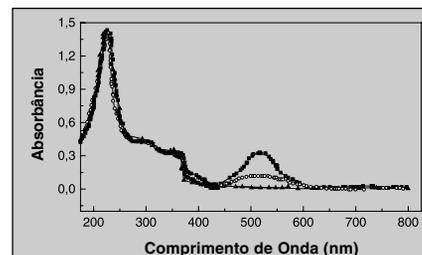


FIG. 3 - Espectros de absorvância do reagente de ácido úrico após 5 min de incubação, a 37°C, (▲) na ausência, (●) na presença de peróxido de hidrogênio 12µM e (■) na presença de peróxido de hidrogênio 12µM e ácido ascórbico 12µM. Um experimento de 2-3 para cada variável está demonstrado.

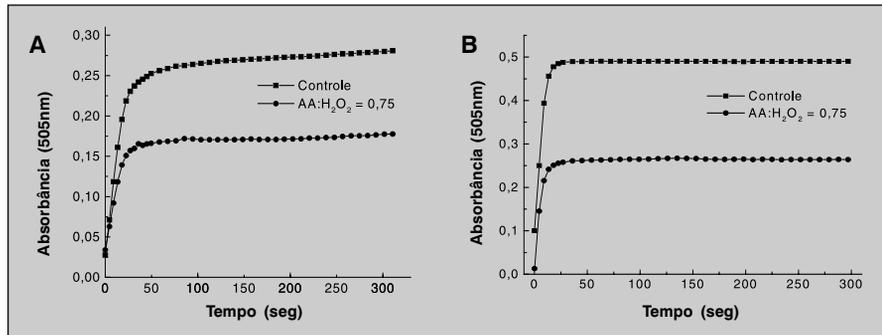


FIG. 4 - Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação da peroxidase para a formação do cromógeno oxidado, a 37°C. Peróxido de hidrogênio (12 ou 120 μ M) foi adicionado aos reagentes de (A) ácido úrico e (B) glicose na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico (9 ou 90 μ M). Os resultados são representativos de 2 ensaios para cada reagente. AA = ácido ascórbico.

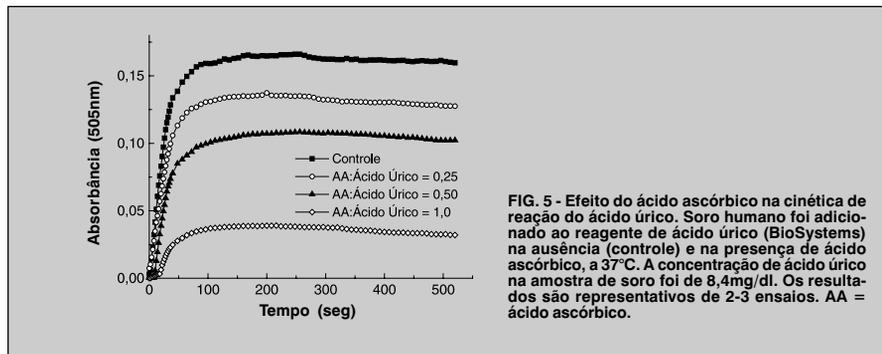


FIG. 5 - Efeito do ácido ascórbico na cinética de reação do ácido úrico. Soro humano foi adicionado ao reagente de ácido úrico (BioSystems) na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico, a 37°C. A concentração de ácido úrico na amostra de soro foi de 8,4mg/dl. Os resultados são representativos de 2-3 ensaios. AA = ácido ascórbico.

gênio (12 ou 120 μ M) e peroxidase com os compostos fenólicos e 4-AF. A Fig. 4 mostra os resultados obtidos com os reagentes de ácido úrico e glicose, porém resultados idênticos foram obtidos com os reagentes do colesterol e triglicérides (não mostrados). Na ausência de ácido ascórbico o cromógeno oxidado foi totalmente formado em 25-50 seg. Quando ácido ascórbico foi adicionado previamente ao sistema (relação molar ácido ascórbico:peróxido de hidrogênio = 0,75), ocorreu diminuição na quantidade do cromógeno formado sem alterar a sua velocidade de formação (Fig. 4). É interessante notar que o efeito foi semelhante para os diferentes reagentes, independente do composto fenólico usado.

• **Efeito do ácido ascórbico na cinética de formação do cromógeno com soro**

Para demonstrar o efeito do ácido ascórbico na cinética da reação de Trinder completa, isto é, incluindo também a primeira fase da reação com a geração do

"lag" na formação do cromógeno e uma diminuição na quantidade total do mesmo. A extensão da fase "lag" e a inibição da formação do cromógeno foram proporcionais à concentração de ácido ascórbico no sistema (Fig. 6) e inversamente proporcionais à quantidade de glicose (não mostrado). É interessante notar, ainda, que esse efeito também esteve inversamente associado à quantidade da enzima glicose oxidase presente nos reagentes (Fig. 6A, B e C). A velocidade de formação do cromógeno na ausência de ácido ascórbico, por sua vez, foi dependente da quantidade de glicose oxidase. O ácido ascórbico também provocou a formação de fase "lag" nos ensaios de colesterol e triglicérides (resultados não mostrados).

• **Efeito do ácido ascórbico na enzima glicose oxidase**

Os resultados das cinéticas das reações da glicose, colesterol e triglicérides sugerem que o ácido ascórbico pode, também, interferir nessas reações através da inibição das oxidases específicas. O efeito do ácido

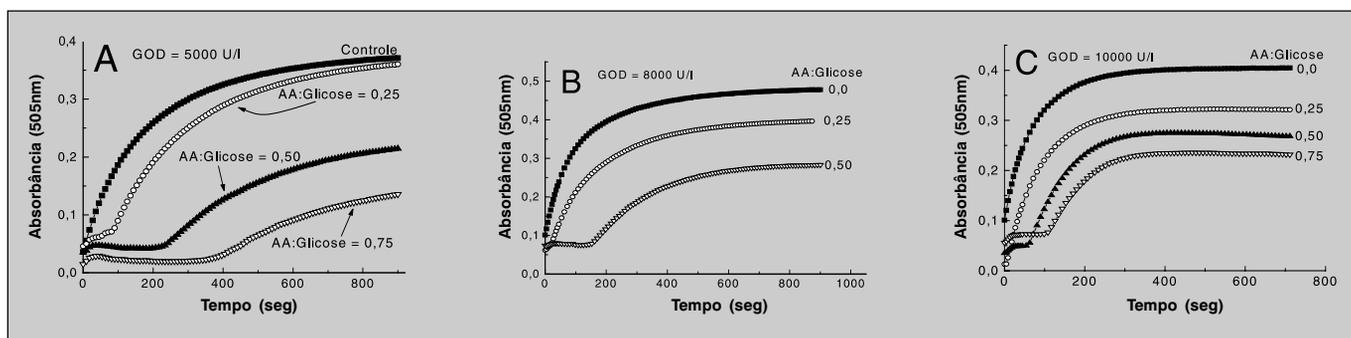


FIG. 6 - Efeito do ácido ascórbico na cinética de reação da glicose. Soro humano (pool) foi adicionado aos reagentes A) Biodiagnóstica, B) Labtest e C) BioSystems, na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico, a 37°C e a quinonaimina formada foi medida em 505nm. A concentração de glicose na amostra de soro foi de 183mg/dl. Os resultados são representativos de 2-3 ensaios para cada reagente. GOD, glicose oxidase; AA:Glicose, relação molar ácido ascórbico:glicose.



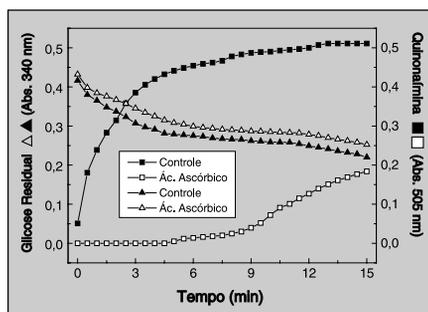


FIG. 7 - Efeito do ácido ascórbico no consumo (oxidação) da glicose catalisada pela glicose oxidase. Soro humano foi incubado com o reagente de glicose (Labtest) na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico a 37°C, durante 15 min. Aliquotas do sistema de incubação foram retiradas nos tempos indicados para a determinação do cromógeno formado em 505nm e da quantidade residual de glicose utilizando-se o método da glicose hexoquinase (Labtest) em 340nm. Os resultados representam a média de 2 experimentos. Para melhor visualização os valores de absorbância da quinonaimina estão divididos por um fator de 4.

ascórbico na glicose oxidase foi verificado através da quantificação da glicose residual, durante a reação de oxidação, e conseqüente formação do cromógeno oxidado (Fig. 7).

Para a medida da glicose residual no sistema de incubação foi utilizado o método da hexoquinase com leituras em 340nm que, conforme demonstrado na Tab. I, não sofre interferência pelo ácido ascórbico. Nesse método a glicose é fosforilada pelo ATP na presença da enzima hexoquinase e magnésio e a glicose-6-fosfato formada é oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase na presença de NADP. A quantidade de NADPH produzido é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra e é medido em 340nm.

Na reação controle (ausência de ácido ascórbico) a glicose foi oxidada pela glicose oxidase com a conseqüente formação da quinonaimina (absorbância 505nm). O consumo de glicose na reação foi de aproximadamente 47% em 15 min de incubação (Fig. 7). Na presença de ácido ascórbico (relação molar ácido ascórbico: glicose = 0,75) ocorreu a fase "lag" de 5-10 min e uma interferência negativa de 64% na formação da quinonaimina. Nessa reação o consumo da glicose foi de aproximadamente 42%. A constante inibição de 5-10% no consumo da glicose na presença de ácido ascórbico deve-se, possivelmente, a um efeito da matriz, pois essa inibição não foi observada quando se utilizou solução

TABELA II
Efeito dos componentes da reação de Trinder no grau de interferência negativa causada pelo ácido ascórbico em tampão fosfato pH 7,0

Componentes (Conc. final)	Interferência Negativa (%)	Componentes (Conc. final)	Interferência Negativa (%)
Fenol (mM)		Peroxidase (U/l)	
2,0	66,4±4,1	500	82,8±6,8
10,0	66,7±3,8	1000	84,4±7,1
100,0	65,2±3,9	5000	89,6±7,0
DHBS (mM)		H₂O₂ (µM) c/ DHBS	
1,0	69,5±4,0	6	84,2±6,0
2,0	70,2±2,8	9	74,2±4,5
4,0	73,6±3,9	12	66,4±3,6
25,0	73,1±4,1	24	60,6±3,3
4-AF (mM)		H₂O₂ (µM) c/ Fenol	
0,1	73,5±2,8	60	99,1±1,0
0,5	76,3±2,7	90	94,8±3,5
1,0	74,8±1,6	120	54,8±2,8
5,0	71,5±3,2	240	47,3±3,4

Condições do ensaio na ausência de ácido ascórbico (controle): Fenol ou Ácido dicloro-hidroxi-benzeno-sulfônico (DHBS), 2,0mM; 4-Aminofenazona (4-AF), 1,0mM; Peroxidase, 1000U/l; Peróxido de hidrogênio, 12µM com DHBS ou 120µM com fenol; Tempo de reação, 10 min após a adição da peroxidase, a 37°C, 505nm. Os resultados são média ± desvio-padrão de 2-3 experimentos para cada variável.

de glicose ao invés de soro humano (resultados não mostrados).

• Reação do ácido ascórbico com os componentes da reação de Trinder

Para verificar se os compostos fenólicos, a 4-AF e a peroxidase reagem com o ácido ascórbico provocando a interferência negativa, foram montados sistemas de reação em tampão fosfato, ou HEPES, pH 7, variando-se as concentrações dos constituintes. Foi utilizado diretamente o H₂O₂, em lugar de soro, na ausência (controles) e na presença de ácido ascórbico.

Os resultados demonstraram que os compostos fenólicos, a 4-AF e a peroxidase, mesmo em grandes concentrações, não reverteram a interferência pelo ácido ascórbico. No entanto, a interferência foi inversamente proporcional à quantidade de H₂O₂ adicionado ao sistema de reação (Tab. II).

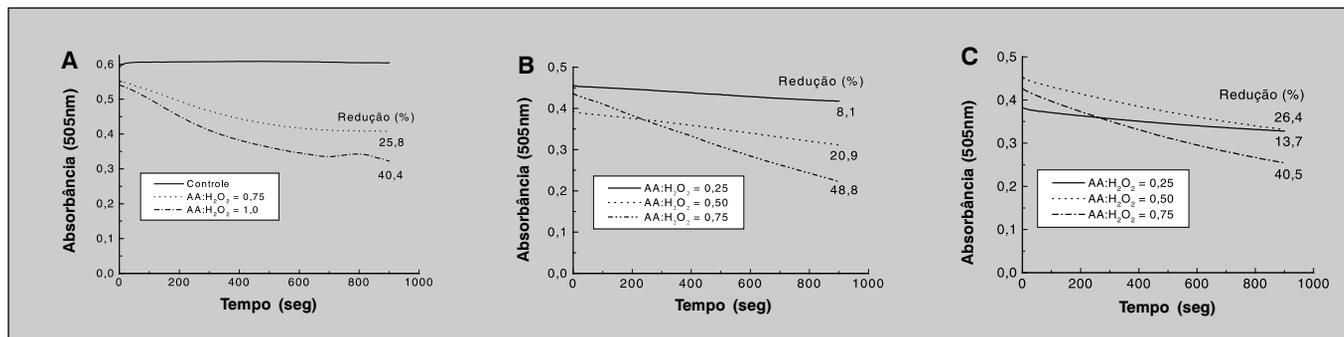


FIG. 8 - Efeito do ácido ascórbico na redução do cromógeno formado. Peróxido de hidrogênio (12 ou 120µM) foi adicionado aos reagentes de A) ácido úrico Labtest, B) triglicérides BioSystems e C) glicose Labtest. Após a formação do cromógeno por 5 min de incubação, diferentes concentrações de ácido ascórbico foram adicionadas e a cinética de redução foi monitorada a 37°C. Os resultados são representativos de 2-3 experimentos para cada reagente.

• Redução do cromógeno colorido formado

Uma das possibilidades de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder é pela redução do cromógeno oxidado formado. Após a formação do cromógeno colorido pela adição de H_2O_2 ou soro humano aos reagentes de ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides, adicionou-se ácido ascórbico em diferentes concentrações e foi verificada a cinética de redução em 505nm. Os resultados mostraram que o ácido ascórbico reduziu os cromógenos formados, porém, apenas na presença de altas concentrações de ácido ascórbico e numa velocidade relativamente pequena, 15 min (Fig. 8). Os percentuais de redução foram semelhantes para os reagentes contendo fenol e clorofenol (48,8 e 40,5%, respectivamente) e ligeiramente menores com DHBS (25,8%).

DISCUSSÃO

Apesar dos inúmeros estudos demonstrando a interferência negativa provocada pelo ácido ascórbico nos ensaios laboratoriais, principalmente naqueles que são baseados no sistema de reação oxidase/peroxidase, o mecanismo da interferência nas reações com 4-aminofenazona (4-AF) e compostos fenólicos encontra-se pouco esclarecido. Alguns autores sugerem que o ácido ascórbico interfere nessas reações por consumir o peróxido de hidrogênio necessário para oxidar o cromógeno, no entanto não apresentam resultados em relação às outras possibilidades de interferência, tais como, redução do cromógeno oxidado, reação com a 4-AF, com os compostos fenólicos, ou ainda, com a enzima oxidase^{3,4,13,16}.

Em nossos estudos anteriores relatamos que a reação do ácido úrico foi mais susceptível ao efeito interferente do ácido ascórbico do que as reações para glicose, colesterol total e triglicérides^{11,14}. Todas essas reações utilizam a 4-AF e diferentes compostos fenólicos, os quais poderiam reagir com o ácido ascórbico de forma diferenciada ou gerar cromógenos oxidados com diferentes graus de susceptibilidade ao ácido ascórbico, particularmente o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno-sulfonato (DHBS) utilizado para o ácido úrico em comparação com o fenol e o cloro-fenol utilizados nas reações do colesterol, glicose e triglicérides. No presente estudo explicamos porque o ácido ascórbico interfere mais facilmente com o ácido úrico e fornecemos informações a respeito do mecanismo da interferência do ácido ascórbico nas reações de Trinder.

A enzima peroxidase reage primeiro, e extremamente rápido, com o H_2O_2 para formar o "composto I", identificado espectrofotometricamente como um heme-complexo intermediário². A peroxidase reage, subsequentemente, com uma grande variedade de substratos, inclusive o ácido ascórbico e a 4-AF. As constantes das reações entre a peroxidase/ H_2O_2 e alguns substratos já foram determinadas e apresentam variações com diferentes ordens de magnitude². Assim, o ácido ascórbico pode competir com a 4-AF pelo peróxido/peroxidase. De fato, a inibição provocada pelo ácido ascórbico na formação do cromógeno oxidado, o qual é rapidamente gerado (25-50 seg; Fig. 4), indica uma maior afinidade do ácido ascórbico pela peroxidase em comparação com a 4-AF e os compostos fenólicos. A ausência de reversão da interferência pela adição de grandes quantidades de 4-AF ou dos compostos fenólicos supor-

ta essa suposição (Tab. II). Além disso, a diminuição da interferência pela adição de quantidades crescentes de H_2O_2 confirma a reação do ácido ascórbico com o peróxido (Tab. II e estudo descrito anteriormente⁹).

O ácido ascórbico também não reagiu com a 4-AF, ou com os compostos fenólicos, formando produto(s) com absorvidade diferente de 505nm (Fig. 3). Esse mecanismo de interferência ocorre, por exemplo, com a 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona utilizada, no passado, nos ensaios para a glicose¹⁷. Confirmação adicional da ausência de reação entre o ácido ascórbico e os diferentes compostos fenólicos foi obtida pela normalização dos resultados do percentual de interferência negativa para o ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides (Tab. I). A transformação dos valores em termos molares ácido ascórbico: analitos demonstrou que os ensaios sofreram o mesmo grau de interferência, independente do tipo de composto fenólico utilizado (Fig. 2). Portanto, ficou comprovado que a diferença no grau de interferência pelo ácido ascórbico nos diferentes analitos bioquímicos, particularmente uma maior interferência nos ensaios para o ácido úrico (Tab. I), deve-se à quantidade de analito presente no sistema de reação e, conseqüentemente, à quantidade de peróxido de hidrogênio gerado, e não ao tipo de composto fenólico utilizado¹⁰.

Os estudos das reações cinéticas envolvendo a primeira parte da reação de Trinder, com a adição de soro humano e a geração do H_2O_2 , demonstraram que o ácido ascórbico apresentou dois comportamentos distintos. Enquanto na reação de ácido úrico, o ácido ascórbico interferiu pelo impedimento da formação do cromógeno oxidado sem modificar a velocidade de formação deste (Fig. 5), para a reação da glicose, colesterol total e triglicérides ocorreu a existência de uma fase "lag" para a formação do cromógeno colorido e a conseqüente interferência negativa (Fig. 6). A extensão da fase "lag" foi diretamente proporcional à quantidade de ácido ascórbico e inversamente proporcional à quantidade de glicose oxidase no sistema (Fig. 6) e à quantidade de amostra e, conseqüentemente, de H_2O_2 no sistema (resultados não mostrados). A formação do cromógeno colorido ocorreu somente quando não havia mais ácido ascórbico no sistema, conforme também demonstrado por Maguire e cols. (1983)⁸. Apesar da existência de uma associação inversa entre a extensão da fase "lag" e da quantidade de glicose oxidase sugerir uma possível inibição dessa enzima pelo ácido ascórbico, nossos resultados demonstraram que esse mecanismo de interferência não ocorre (Fig. 6). Utilizamos para essa medida a quantificação da glicose residual após a oxidação pela glicose oxidase, na ausência e na presença de ácido ascórbico. O consumo de glicose foi semelhante em ambas as situações, confirmando a falta de inibição das oxidases pelo ácido ascórbico, conforme sugerido anteriormente¹⁶. O efeito do ácido ascórbico nas enzimas colesterol oxidase e glicerol oxidase usadas nos métodos para a determinação de colesterol e triglicérides, respectivamente, não foi avaliado, consideramos, porém, pouco provável a interferência nessas enzimas específicas.

No momento, uma explicação plausível para a existência da fase "lag" provocada pelo ácido ascórbico nas reações de glicose, colesterol e triglicérides seria a velocidade com que as oxidases específicas atuam sobre os substratos (analitos) gerando o peróxido de hidro-

gênio. O H₂O₂ gerado numa pequena velocidade parece favorecer a sua reação com o ácido ascórbico formando a fase "lag", ao invés de oxidar a 4-AF. Nos sistemas de reações em que o H₂O₂ foi formado rapidamente, pela característica da oxidase específica, como no caso da uricase (Fig. 5), ou pela adição de peróxido diretamente ao sistema de reação (Fig. 4), não se observou a existência da fase "lag", independente do composto fenólico utilizado.

É interessante notar que, se compararmos a interferência entre os diferentes reagentes para a glicose considerando a mesma relação molar ácido ascórbico:glicose (Figs. 6A, B e C), a extensão da fase "lag" não modificou expressivamente o nível final de interferência causada pelo ácido ascórbico para a glicose. Assim, métodos cinéticos para glicose, colesterol e triglicérides são, potencialmente, mais susceptíveis à interferência pelo ácido ascórbico. O grau de interferência na cinética dependerá, ainda, da concentração da enzima oxidase, do tempo pelo qual a reação é monitorada e, naturalmente, da quantidade de ácido ascórbico presente na amostra. Uma solução para esse tipo de interferência pode ser o uso de métodos de ponto final, nos quais a inibição é mínima com pequenas concentrações de ácido ascórbico (Tab. I), ou usar métodos resistentes ao efeito do ácido ascórbico, como o método da hexoquinase para a glicose. Vale a pena salientar que interferências significativas para a glicose, colesterol total e triglicérides só ocorreram na presença de grandes quantidades de ácido ascórbico (Tab. I), as quais são encontradas no plasma sanguíneo somente em tratamentos endovenosos com megadoses de vitamina C¹. Após a ingestão de até 4g/d de vitamina C não observamos alterações nos valores desses analitos bioquímicos^{11,14}.

Uma forma adicional de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder pode ser pela redução do cromógeno formado, conforme especulado por Fossati e cols.³. Nossos resultados demonstraram que o ácido ascórbico adicionado após a formação do cromógeno oxidado diminuiu, realmente, a quantidade do cromógeno colorido, independente do composto fenólico usado para a sua geração (Fig. 8). Porém, o baixo percentual de redução e o elevado tempo necessário (10-15 min) não justificariam totalmente a interferência causada pelo ácido ascórbico. Esse tipo de interferência ocorre com cromógenos que apresentam potencial de óxido-redução maior que o do ácido ascórbico, como a o-toluidina, criando um ciclo de formação do cromógeno oxidado e imediata redução do mesmo pelo ácido ascórbico, dando origem, inclusive, a uma fase "lag" até o completo consumo do ácido ascórbico¹⁸.

Pelo conjunto de resultados apresentados nesse trabalho e por nossos relatos já publicados^{9,10} podemos concluir, então, que:

- o cromógeno oxidado resultante da reação do H₂O₂/peroxidase com a 4-AF e compostos fenólicos é resistente à redução pelo ácido ascórbico;

- que a 4-AF, os compostos fenólicos e as enzimas oxidases e peroxidases não reagem com o ácido ascórbico;

- que o principal mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder utilizando a 4-AF e compostos fenólicos, como DHBS, fenol e diclorofenol, foi pelo consumo do peróxido de hidrogênio e;

- que o ácido úrico é mais susceptível à interferên-

cia pelo ácido ascórbico em comparação com a glicose, colesterol e triglicérides devido à quantidade menor do mesmo na amostra (~ 5,0mg/dl versus ~ 100mg/dl, respectivamente) e à conseqüente menor geração de H₂O₂ na reação de Trinder. Assim, uma possível forma de minimizar a interferência negativa causada pelo ácido ascórbico na reação de Trinder seria a incorporação de substâncias inibidoras (oxidantes) do ácido ascórbico aos reagentes, a utilização de métodos alternativos mais resistentes (quando houver) e/ou a suspensão da ingestão de vitamina C, conforme sugerido anteriormente^{11,14}.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratórios Labtest Diagnóstica, Bioclin, Celm, BioSystems e Biodiagnóstica pelo fornecimento dos "kits" de reagentes. À Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte financeiro (FUNPESQUISA). FM foi bolsista de mestrado da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

1. Badrick, T. & Campbell, B. Effects of intravenous infusion of ascorbate on clinical chemistry tests. *Clin. Chem.* 38 (10): 2160, 1992.
2. Chance, B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase. *J. Biol. Chem.* 151: 553-577, 1943.
3. Fossati, P., Prencipe, L. & Berti, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26 (2): 227-231, 1980.
4. Gochman, N. & Schmitz, J.M. Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clin. Chem.* 17 (12) 1154-1159, 1971.
5. Haber, F. & Weiss, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London A.* 147: 332-351, 1934.
6. Hirata, F. & Hayaishi, O. Studies of indoleamine 2,3-dioxygenase I. Superoxide anion as substrate. *J. Biol. Chem.* 250: 5960-5966, 1975.
7. Johnson, J.D. & Overby, R. Stabilized neutral ortho-tolidine, SNORT, colorimetric method for chlorine. *Anal. Chem.* 41: 1744-1750, 1969.
8. Maguire, G.A., Price, C.P. Evidence for interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure. *Clin. Chem.* 29 (10): 1810-1812, 1983.
9. Martinello, F. & Silva, E.L. Phenolic compounds do not affect interference by ascorbic acid in biochemical tests that use oxidase/peroxidase systems. *Eur. J. Pharm. Sciences* 13: S26, 2001.
10. Martinello, F. & Silva, E.L. Mechanisms of ascorbic acid interference in biochemical tests that use the Trinder's reaction. *Eur. J. Pharm. Sciences* 13: S27, 2001.
11. Martinello, F. & Silva, E.L. Interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudos in vivo e in vitro. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 39: 357-368, 2003.
12. Pedrazzi, A.H.P., Rodrigues, E.R. & Zanardo-Filho, A. Ação redutora da vitamina C em bioquímica clínica. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 30 (1): 5-6, 1998.
13. Sharp, P. Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. *Clin. Chim. Acta* 40: 115-120, 1972.
14. Silva, E.L., Sharf, E.R., Martinello, F., Luca, D.M., Amorim, G.R., Corradi, L. & Martins, T.R. Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 31 (3): 111-115, 1999.
15. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24-27, 1969.
16. White, A., Handler, P. & Smith, E.L. *Princípios de Bioquímica* 5ª ed., Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, p. 264, 1976.
17. White-Stevens, R.H. & Stover, L.R. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems. *Clin. Chem.* 28 (4): 589-595, 1982.
18. White-Stevens, R.H. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clin. Chem.* 28 (4): 578-588, 1982.
19. Yamazaki, I. & Piette, L.H. The mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 47-64, 1963.
20. Yamazaki, I., Mason, H.S. & Piette, L.H. Identification, by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrate by peroxidase. *J. Biol. Chem.* 235: 2444-2449, 1960.
21. Zoppi, F. & Fenili, D. Drug interferences in reactions for detecting hydrogen peroxide by means of peroxidase. *Clin. Chem.* 26: 1229-1230, 1980.

Endereço para correspondência

Edson Luiz da Silva
Departamento de Análises Clínicas, CCS - UFSC,
Campus Universitário, Trindade, Florianópolis-SC. CEP 88.040-970
E-mail: edson@ccs.ufsc.br

Caracterização microbiológica do leite humano processado em banco de leite de João Pessoa – PB*

Microbiologic characterization of human milk processed from milk bank in João Pessoa, Paraíba/Brazil

Adalberto Coelho da Costa¹; Cristina Paiva Sousa² & Lauro Santos Filho³

RESUMO – O leite constitui um excelente meio de cultura que permite a multiplicação de um grande número de espécies de microrganismos. A manutenção da qualidade do leite pasteurizado depende de muitos fatores desde a ordenha até o consumo, incluindo qualidade bacteriológica do leite cru, condições de pasteurização e condições higiênico-sanitárias. Neste trabalho, objetivamos verificar a qualidade do leite humano "in natura" e pasteurizado, fornecido pelo Banco de Leite Humano Anita Cabral (BLHAC) aos recém nascidos de João Pessoa. As análises evidenciaram 100% de positividade para bactérias mesófilas, nas amostras de leite humano cru. Apenas 6 amostras apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos, comparado com os padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente. Das 30 amostras de leite cru analisadas, foram isolados *K. pneumoniae* (25,5%), *E. coli* (1,8%), *Staphylococcus coagulase negativa* (41,8%), *S. aureus* (12,7%), *E. faecalis* (3,6%), *P. aeruginosa* (5,5%) e *C. albicans* (9,1%). A análise microbiológica do leite humano pasteurizado mostrou a eficácia deste processo em 100% das amostras. Foi confirmada a contaminação do leite pasteurizado e rejeitado pelo controle da qualidade do BLHAC. Sendo que das 15 amostras rejeitadas de leite pasteurizado pelo controle da qualidade, 40%, foram positivas, para bactérias mesófilas. Em três (20%) detectou-se a presença de coliformes. Em duas (13%) a presença de *B. cereus*. A pesquisa de fungos filamentosos e leveduras foi negativa em todas as amostras. O BHI possibilitou o crescimento de *A. baumannii* em três amostras (20%), o que havia sido detectado nas análises anteriores e revelou dois novos casos de positividade para *P. aeruginosa* (13%). Conclui-se que a avaliação microbiológica deve ser obrigatoriamente instituída como rotina.

PALAVRAS-CHAVE – Leite humano, controle microbiológico, banco de leite.

SUMMARY – The milk is an excellent medium culture to a great number of bacteria. The quality of pasteurized milk depends from many factors including bacteriological aspects such hygienic conditions and storage temperature. This work presents how to verify the "in natura" human milk quality offered to the newborn children after pasteurization in the "Anita Cabral" Human Milk Bank (ACHMB) at João Pessoa/PB, Brazil. It was found a 100% positivity of mesophilic bacteria in the crude milk samples. Only 6 samples were considered into the established standards when compared to the microbiological patterns required by the actual normatization. The total and fecal coliform presence was detected in 14 samples (47%) and the *E. coli* was present in one. Among 30 crude milk analyzed samples in 5 was detected yeasts without filamentous fungi. An elevated positivity percentual to coagulase negative *Staphylococcus* was detected and the *S. aureus* were in 7 samples (23%). The pasteurized human milk was free of the bacteria and demonstrate the process efficacy. In other hand from 15 samples rejected by the quality control system, 6 (40%) were positive to mesophilic bacteria, probably by the great volume of milk at the bottle without uniform and adequate temperature. Also was detected a coliforms presence in 3 of these samples (20%). It was detected *B. cereus* in 2 of pasteurized milk. The presence of filamentous fungi was negative in all milk samples and using the Brain Heart Infusion could be detected *A. baumannii* in 3 samples (20%) isolated in previous analysis and detect 2 new cases of *P. aeruginosa* (13%). In conclusion, the microbiological evaluation may be adopted as service routine.

KEYWORDS – Human milk, microbiologic control, milk bank.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o leite humano é definido como o alimento mais completo para a criança, nos primeiros 6 meses de vida, devendo ser fornecido até os dois anos de idade, segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), por se constituir numa fonte de proteínas de boa qualidade, cálcio, riboflavina e vitamina A. Além de prover todos os nutrientes necessários para o lactente, o leite materno previne uma série de doenças pela presença de anticorpos. O leite é um alimento capaz de suprir todas as necessidades orgânicas da criança durante os seus 6 primeiros meses de vida (Schimitz *et al.*, 1989; Marcondes, 1992). Por volta do 6º mês, devido à introdução de novos há-

bitos alimentares, o leite da mãe deixa de ser um alimento exclusivo, sendo necessário usar-se a fibra alimentar e maiores teores de ferro e de vitamina C (Herbert, Kasdan, 1995; Occhiuzzo, 2000).

O leite humano é utilizado pelos lactentes que, em geral, mamam diretamente no peito da mãe, constituindo-se no princípio do relacionamento entre mãe e filho. No entanto, quando os recém-nascidos são clinicamente impossibilitados de mamar naturalmente, torna-se necessário à ordenha do leite humano. Por outro lado, existem os casos de mães que não produzem o leite em quantidade suficiente para a alimentação da criança, necessitando, portanto, do leite obtido de outras mães. A partir desta necessidade, foram criados os Bancos de Leite Humano (Brasil, Ministério da Saúde, 1998).

Recebido em 22/11/2003
Aprovado em 4/4/2004

¹Prof. do Deptº de Ciências Farm./CCS/UFPB. Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos. ²Profª do Deptº de Nutrição/CCS/UFPB. Doutora em Microbiologia.

³Professor do Deptº de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB. Doutor em Microbiologia.

*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da UFPB

A utilização de indicadores físico-químicos para controlar a qualidade do leite humano ordenhado representa uma alternativa capaz de compatibilizar o custo operacional do controle com as exigências nutricionais dos consumidores. Dentre as características que definem o valor nutricional do leite humano ordenhado, destacam-se o teor de gordura e o conteúdo energético (Brasil, Ministério da Saúde, 1998).

Outro parâmetro que está intrinsecamente relacionado com a qualidade do leite é a sua característica microbiológica. Pouco se conhece sobre sua microbiota, e que implicações, como as técnicas de coleta, distribuição e acondicionamento, podem influir na qualidade do leite quando administrado aos lactentes. Por isso, o controle microbiológico do leite humano é uma exigência fundamental feita pelo Ministério da Saúde, para garantir a oferta de leite humano isento de agentes contaminantes, evitando assim que os recém-nascidos alimentados com este leite venham a se contaminar pela ingestão de microrganismos patogênicos.

Os Bancos de Leite Humano (BLH) constituem uma alternativa promissora para a saúde de recém-nascidos, uma vez que o leite oferecido através desse sistema tem condições de proporcionar à criança todos os nutrientes necessários à sua sobrevivência. Além disso, devido ao seu conteúdo em anticorpos, pode prevenir e, conseqüentemente, evitar doenças.

O primeiro Banco de Leite Humano (BLH) do Brasil foi implantado em outubro de 1943, no então Instituto Nacional de Puericultura, atualmente Instituto Fernandes Filgueira (IFF), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. Seu principal objetivo era coletar e distribuir leite humano para atender os casos considerados especiais, como prematuridade, perturbações nutricionais e alergias a proteínas heterólogas (Barata, 1960). Contudo, foi ao longo dos anos 80, particularmente a partir de 1985 que se observou uma verdadeira expansão, com a instituição de 47 novos serviços que, somados às 56 implantações ocorridas na década de 90, passaram a totalizar 104 unidades em funcionamento no País, segundo estimativa apresentada no I Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano, realizado em Brasília em julho de 1998 (Almeida *et al.*, 1998).

O pioneirismo da política de aleitamento materno no Brasil liderou um trabalho que culminou na constituição da maior rede de bancos de leite do mundo. A rede é constituída atualmente de 136 unidades em funcionamento, com expansão projetada em 25% para o próximo quadriênio. Propondo ao mundo o aleitamento exclusivo até os 6 meses, esta prática mostra a importância do leite materno para a nutrição da criança. Este trabalho foi motivo de reconhecimento do Prêmio Sasakawa 2001, pela redução da mortalidade infantil durante a década de 90 (Machado, 2001).

Devido a sua complexidade e riqueza em nutrientes, o leite é um dos melhores meios de cultura, apresentando-se esplendidamente à reprodução ativa da maioria dos microrganismos encontrados na natureza, principalmente quando mantido na temperatura de recém-ordenhado (Schmidt *et al.*, 1980; Schwartzman, 1980; Vesoni, 1986; Behmer, 1991). Os principais contaminantes do leite poderiam incluir: as mãos do manipulador, a pele, o mamilo, o cabelo, a respiração, os utensílios, a água de lavagem dos mamilos (Lerche, 1969; Leão, 1973; Oliveira, 1976; Schmidt *et al.*, 1980; Vesoni *et al.*, 1986; Schwartzman, 1990).

De acordo com o Ministério da Saúde (1998), o leite materno, como alimento para lactente, não constitui

motivo de dúvidas e vem sendo cada vez mais imposto, à medida que suas propriedades e as particularidades fisiológicas beneficiem o metabolismo da criança. A sua melhor digestibilidade e composição balanceada representam fatores de superioridade em comparação com leite de outras espécies, assim como, a ausência de fenômenos alergênicos, a proteção conferida contra infecções e o relacionamento afetivo entre mãe e filho.

O MS (1998), define Banco de Leite Humano como centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e execução de atividade de coleta, processamento e controle da qualidade de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sobre prescrição de médicos ou nutricionistas, sendo este obrigatoriamente vinculado a um hospital materno e/ou infantil.

Os leites ordenhados são pasteurizados, ou seja, passam por um tratamento que visa a inativação térmica de microrganismos patogênicos e 97% da microbiota indesejável através do binômio temperatura/tempo de 62,5°C por 30 minutos ou equivalente, calculando de modo a promover equivalência a um tratamento 15D para a inativação térmica da *Coxiella burnetti*, além de todas as leveduras, fungos filamentosos, bactérias Gram-negativas e muitas Gram-positivas, (Alais 1970; Veisseyre, 1988; Franco e Landgraf, 1996; Ministério da Saúde, 1998). É importante saber, que a pasteurização inativa as enzimas bacterianas presentes no leite segundo (Fellows, 1994), mas não modifica o seu sabor e pouco altera seu valor nutritivo (McCance, Widdson's, 1985). Dependendo da temperatura a que o leite é submetido, a digestibilidade de suas proteínas é mais ou menos afetada, sendo que as principais conseqüências são físicoquímicas como desnaturação e coagulação das proteínas (Forsyth, 1992).

Segundo Barros (1984) e Behmer (1991) a eficácia deste processo pode ser investigada através da pesquisa das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase, visto que estas enzimas são termosensíveis e estão presentes no leite cru. Quando a pasteurização for realizada adequadamente a fosfatase alcalina é inativada, enquanto a lactoperoxidase não é destruída totalmente por este processo térmico.

O leite constitui-se em um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos encontrados na natureza, além de sofrer alterações com grande facilidade em curto espaço de tempo. A microbiota corresponde aos microrganismos patogênicos e/ou indesejáveis presentes no colostro, no leite de transição e no leite maduro, sendo considerada microbiota primária aquela decorrente do interior das mamas e secundária, a que se origina de agentes externos.

O presente estudo teve como objetivo principal caracterizar a contaminação microbiológica de leite humano, como controle da qualidade para a sua utilização por recém nascidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Coleta e estocagem do leite: o leite foi coletado em condições assépticas, colocado em frascos de vidro estéreis e acondicionado no congelador doméstico, até serem enviados para o Banco de Leite Humano Anita Cabral (BLHAC), Complexo de Saúde de Cruz das Armas/João Pessoa - PB. Foi efetuado o registro da doadora, e os dados foram identificados e repassados para o frasco. As amostras foram mantidas congeladas até o momento da pasteurização, após a qual foram retirada-

das alíquotas de quatro mL, de cada amostra, para o controle microbiológico.

Amostras analisadas - As amostras foram coletadas quinzenalmente no período de agosto a dezembro de 2000, obtendo-se 45 amostras, com as quais realizaram-se 60 análises, divididas em três grupos: Grupo **I**: Constituído de 30 amostras de leite cru provenientes das doadoras. Grupo **II**: Constituído de 15 amostras do leite cru que foi pasteurizado a (62,5°C/30 minutos). Grupo **III**: Constituído de 15 amostras de leite pasteurizado e rejeitado pelo BLHAC.

Métodos

• **Análises microbiológicas** - Foram realizadas 60 análises microbiológicas com os grupos de amostras citados. As amostras coletadas foram conduzidas congeladas em caixa térmica ao Laboratório de Microbiologia do DTQA/CT/UFPB, em João Pessoa-PB, onde os experimentos foram executados. Após o descongelamento do leite não pasteurizado (procedimento conduzido lentamente em temperatura de +/- 7°C em refrigerador), as amostras foram submetidas a uma temperatura de 40°C em banho-maria durante 10 minutos, fazendo-se, a intervalos regulares, uma homogeneização com a finalidade de uniformizar a temperatura.

Foram retiradas alíquotas das amostras para diluição e análises. Após as análises microbiológicas, 15 destas amostras foram pasteurizadas e também analisadas. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata para a contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e/ou anaeróbias facultativas, pesquisa de *Staphylococcus* e fungos filamentosos e, em triplicata, para a pesquisa de coliformes.

• **Preparo das amostras** - As amostras do leite cru (grupo I), pasteurizadas (grupo II) e pasteurizadas rejeitadas (grupo III) foram processadas assepticamente. A 1ª alíquota considerada (10⁰) era constituída do leite puro. A partir desta, transferiu-se 1,0mL da diluição 10⁰ para um tubo contendo 9,0mL do diluente, obtendo-se a diluição 10⁻¹. As diluições subsequentes (10⁻² e 10⁻³) foram obtidas similarmente (ABNT, 1988; Lanara, 1982).

• **Contagem total de bactérias mesófilas** - Para a contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e/ou anaeróbias facultativas viáveis utilizou-se o método de plaqueamento por profundidade ou "pour plate" (Apha, 1985). Colocou-se 1mL de cada diluição decimal em placas de Petri 15x100mm vazias e estéreis, adicionando-se um volume de 20mL de meio fundido (Plate Count Agar, Merck). As placas foram homogeneizadas com movimentos suaves circulares de 8 a 10 vezes no sentido horário e anti-horário e deixadas para solidificar à temperatura ambiente. Após a solidificação completa do meio, procedeu-se a incubação em estufa bacteriológica na temperatura de 35°C (+/- 2°C), durante um período de 24/48 horas.

• **Contagem de leveduras** - Para a contagem de leveduras foi utilizado Potato Dextrose Ágar (Merck), acidificado (pH 3,5), nas mesmas condições que a inoculação anteriormente descritas, incubando-se a 25°C durante 72/120 horas.

• **Pesquisa de *Staphylococcus aureus*** - Para a pesquisa de *S. aureus* foi usado Ágar Manitol Salgado (Merck), empregando-se a técnica de semeadura em superfície do ágar (Vanderzant e Splitoesser, 1992). As placas foram incubadas a 35°C (+/- 2°C), durante 18/24 horas.

• **Determinação do Número Mais Provável** - Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de co-

liformes totais, coliformes fecais e *E. coli*, foram utilizadas três séries de tubos em triplicata, contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (Merck). Para a diferenciação dos coliformes totais dos fecais, foi usado Caldo Lactosado Bile 2% Verde Brilhante (Merck), incubado a 35°C (+/- 2°C), durante 24/48 horas. Foram retiradas alíquotas das amostras para diluição e análises. Após as análises microbiológicas, 15 destas amostras foram pasteurizadas e também analisadas. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata: contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e/ou anaeróbias facultativas, pesquisa de *Staphylococcus*, fungos filamentosos e leveduras e, em triplicata, pesquisa de coliformes.

• **Pasteurização** - Realizadas as análises no leite não pasteurizado, foi feita a pasteurização, utilizando-se o mesmo material, que consistiu no tratamento das amostras sob as seguintes condições: os frascos foram colocados em banho-maria a 65°C, dotado de uniformizador de temperatura durante 5 minutos (a partir deste tempo, o leite foi pasteurizado durante 30 minutos, com homogeneização a cada 5 minutos), objetivando-se alcançar uma temperatura de 62,5°C na zona D do recipiente. As amostras pasteurizadas foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e, em seguida, retiradas alíquotas de 1 mL para as análises, seguindo-se o mesmo procedimento realizado para o leite não pasteurizado.

• **Análises microbiológicas do leite pasteurizado** - Estas análises foram realizadas igualmente às do leite cru, descritas anteriormente.

• **Análise microbiológica do leite rejeitado** - Após o descongelamento do leite em refrigerador, as 15 amostras foram submetidas a dois processos distintos:

a) As amostras foram analisadas similarmente às do leite cru descritas anteriormente **b)** Após as análises microbiológicas do leite rejeitado, colocou-se 1,0mL de cada diluição do leite em tubos de ensaio 13x100mm, contendo 4,0mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI, Merck) estéril, sendo estes incubados a 35°C (+/- 2°C), durante 24 horas. Dos tubos que se apresentaram turvos, retirou-se uma alçada deste meio e semeou-se em Ágar Nutriente (Merck), usando a técnica de estrias sucessivas em superfície. Realizou-se o mesmo processo em EMB Ágar (Merck), em Ágar Manitol Salgado (Merck), e Potato Dextrose Ágar (PDA, Merck). As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 35°C +/- 2°C durante 24 horas, e as placas com PDA acidificado foram incubadas a 25°C durante 72/120 horas.

• **Identificação dos microrganismos isolados** - Para a identificação preliminar de todas as bactérias isoladas, foi realizado o método clássico da coloração de Gram, com a finalidade de observar às propriedades morfotintoriais dos microrganismos. Foram utilizados testes convencionais para a identificação dos microrganismos, que são baseados no comportamento bioquímico frente aos mais variados substratos. Esses testes são baseados na observação da capacidade dos microrganismos produzirem determinadas reações bioquímicas (Ewing, 1986).

• **Identificação de *Candida albicans*** - A identificação das leveduras foi feita pelos métodos clássicos: tubo germinativo, pseudofilamentação e produção de fontes de carbono e nitrogênio - auxonograma. Seguiu-se a metodologia citada (Kryger van Rij, 1984; Kurtzman, 1998; Lacaz, 1991). **a)** Testes Morfológicos - Tubo Germinativo; **b)** Microcultivo (Prova de Pseudofilamentação e Clamidósporo); **c)** Provas Bioquímicas - Zimograma / Auxonograma / Urease.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas realizadas em 30 amostras de leite humano cru não submetidas ao processo de pasteurização são comentados como segue. Observou-se a presença de bactérias mesófilas em todas as amostras (100%). O número de bactérias mesófilas apresentou valores que variaram de $1,1 \times 10^2$ a $3,7 \times 10^5$ UFC/mL de leite.

Considerando-se a inexistência de padrões nacionais referentes à qualidade do leite materno, ao comparar-se os resultados obtidos com os padrões microbiológicos, exigidos na legislação vigente para o leite bovino tipo A, a qual estabelece limites de até $2,0 \times 10^3$ UFC/mL de leite. Foi observado que, apenas seis amostras, as de números 1, 2, 3, 10, 16 e 23 apresentavam-se dentro destes limites e apresentaram média de contagem de $4,5 \times 10^2$, $1,1 \times 10^2$, $8,5 \times 10^2$, $3,8 \times 10^2$, $5,8 \times 10^2$ e $3,7 \times 10^2$ UFC/mL de leite, respectivamente.

Estas amostras evidenciaram contagem muito inferior às encontradas por Carvalho e cols. (2000), cujos valores foram acima dos permitidos para leite bovino, pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), cuja contagem de mesófilos para os leites tipo A e B foram respectivamente, $1,0 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Das 30 amostras de leite cru analisadas, a presença de coliformes totais e coliformes fecais foi detectada em 14 destas amostras, equivalendo a um percentual de 47%, sendo que os valores de coliformes totais e coliformes fecais variaram ambos $<0,3$ a $= 2,4 \times 10^2$. Vale citar que houve uma predominância de amostras com valores $<0,3$. O NMP de *E. coli* foi detectado em elevada concentração ($2,4 \times 10^2$ UFC/mL) em apenas uma amostra, observando-se que as demais tiveram contagem $<0,3$ para este microrganismo. Os padrões microbiológicos para o leite do tipo A, estabelecem em relação a coliformes um máximo de 1 coliforme por mL de leite e ausência de coliformes fecais por mL do produto oferecido.

Diante do exposto, mesmo sem o processamento indicado como Norma pelo Ministério da Saúde, para posterior distribuição e utilização do leite humano, 53% das amostras do leite cru analisadas mostraram que em relação a coliformes totais e coliformes fecais, estavam em condições de consumo.

Os resultados mostraram que apenas os fungos filamentosos estavam ausentes em todas as amostras de leite humano não pasteurizado. As leveduras foram

TABELA I
Percentual de cepas bacterianas isoladas nos três tipos de leite humano

Bactérias	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Staphylococcus</i> cag. negativa	23	42	—	—	—	—	23	29,5
<i>S. aureus</i>	07	13	01	11	01	07	09	11,5
<i>E. coli</i>	01	02	—	—	—	—	01	1,3
<i>K. pneumoniae</i>	14	26	03	34	03	21	20	25,6
<i>E. faecalis</i>	02	04	—	—	—	—	02	2,6
<i>P. aeruginosa</i>	03	04	03	33	05	37	11	14,1
<i>B. cereus</i>	—	—	02	22	02	14	04	5,1
<i>A. baumannii</i>	—	—	—	—	03	21	03	3,9
<i>C. albicans</i>	05	09	—	—	—	—	02	6,4
Total	55	70,5	09	11,5	14	18,0	78	100

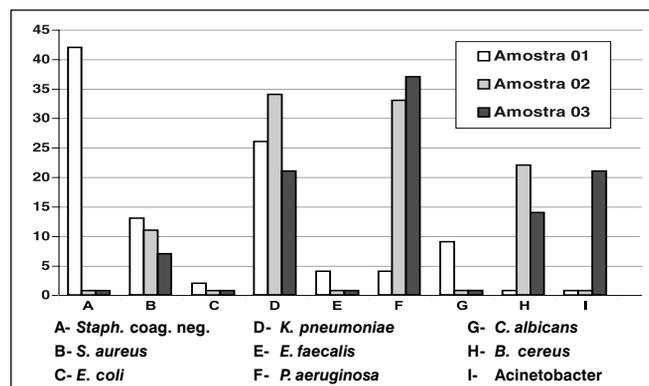


FIG. 1 - Frequência dos microrganismos isolados nos três tipos de leite humano.

detectadas em 5 amostras, com valores que variaram de $7,7 \times 10^2$ a $5,1 \times 10^4$ UFC/mL de leite. É importante citar que fungos filamentosos e leveduras quando presentes no leite não trazem grandes transtornos para o consumidor porém, tratando-se do usuário deste produto, é melhor que esteja isento ou com um número mínimo permitido pela legislação para o leite tipo A, ou seja, $2,0 \times 10^3$ UFC/mL.

S. aureus esteve presente em 7/30 amostras (23%), enquanto o *Staphylococcus* coagulase negativa foi determinado em 23/30 amostras (77%), um percentual bastante elevado para este último. Estes resultados podem ser justificados, levando-se em consideração que este microrganismo faz parte da microbiota normal da pele, das mãos, e do trato respiratório superior do homem. *S. aureus* é uma bactéria patogênica, representando perigo potencial à saúde pública. Devido a enterotoxina estafilocócica produzida em alimentos e sua termoestabilidade, constitui uma das principais causas das intoxicações alimentares. Depois de um curto período de incubação, o processo se manifesta muitas vezes de modo fulminante, sendo o vômito e a diarreia seus principais sintomas (Franco e Landgraf, 1996).

Em relação aos microrganismos isolados, obteve-se os seguintes casos: *S. aureus*, 7/55 (12,7%), *Staphylococcus* coag. neg., 23/55 (41,8%), *E. coli* 1/55 (1,8%), *K. pneumoniae* 14/55 (25,5%), *P. aeruginosa* 3/55 (5,5%), *E. faecalis* 2/55 (2,6%) e *C. albicans* 5/55 (9,1%). É importante citar que, se considerarmos todos os microrganismos presentes, a análise quantitativa mostrou um número máximo de espécies encontradas por amostra (5).

As 15 amostras pasteurizadas (100%), apresentaram resultados negativos nas análises microbiológicas, confirmando a eficácia do processo de pasteurização. Esta temperatura e tempo foram suficientes para a destruição de microrganismos patogênicos não formadores de esporos, além de leveduras e fungos filamentosos.

Nas análises microbiológicas realizadas nas 15 amostras de leite que foram submetidas à pasteurização e rejeitadas pelo controle da qualidade, por esta presença de bactérias mesófilas foi positiva em 6 amostras (40%), menor que o do leite "in natura", porém, elevado por se tratar de um leite já processado. O número de bactérias mesófilas variou de $2,5 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^4$ UFC/mL de leite. Exceto a amostra 9, as demais amostras positivas estavam com os valores acima do limite estabelecido para o leite bovino tipo A (Ministério da Saúde, 1980).

A presença de coliformes totais e fecais foi detectada em três amostras (20%), e os valores de coliformes totais e fecais variaram $<0,3$ a $0,7 \times 10$. Vale citar que

houve dois valores com 0,4x10 e um valor com 0,7x10 (a predominância foi <0,3). Não foi detectado NMP de *E. coli*, pois, todas as amostras tiveram contagem <0,3 para este microrganismo. Nas análises dos microrganismos isolados os resultados mostraram que os fungos filamentosos e leveduras estiveram ausentes nessas amostras analisadas. Assim sendo, o leite humano estava apto para o consumo.

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas 15 amostras de leite humano ordenhado, que foram submetidas à pasteurização e rejeitadas pelo controle de qualidade por estarem contaminadas por coliformes e que foram enriquecidas no BHI. Nessas amostras não foram pesquisados a presença de bactérias mesófilas, nem o NMP de coliformes pois, quando enriquecidas apresentariam valor muito alto em relação às amostras não enriquecidas. Vale salientar que as amostras negativas para coliformes, mesmo após serem enriquecidas, não revelaram a presença de coliformes totais e coliformes fecais. Portanto, a presença do coliforme *K. pneumoniae* permaneceu igual ao do leite rejeitado não enriquecido (20%).

Nas análises dos microrganismos isolados, o resultado para fungos filamentosos e leveduras permaneceu igual ao do leite pasteurizado e rejeitado não enriquecido, ou seja, permaneceram ausentes em todas as amostras (100%).

Para os microrganismos isolados, observou-se que os resultados foram similares aos do leite pasteurizado e rejeitado pelo controle de qualidade para *S. aureus* (7%) e para *B. cereus* (13%). Cinco amostras (33%), apresentaram presença de *P. aeruginosa*, (13%) a mais do que o leite pasteurizado e rejeitado pelo controle de qualidade. Três amostras apresentaram a presença de *A. baumannii* (20%). Vale salientar que estes microrganismos não foram detectados nos leites pasteurizados e rejeitados pelo controle de qualidade sem enriquecimento prévio. A Tab. I e Figura 1, mostram os microrganismos isolados nas três amostras, bem como os percentuais dos mesmos.

CONCLUSÕES

- A detecção de bactérias mesófilas em todas as amostras examinadas justifica o controle de qualidade através da avaliação rotineira do aspecto microbiológico do leite humano cru, considerando que entre estas amostras estudadas apenas 20% apresentou-se dentro dos limites estabelecidos.

- Conclui-se que o nível de contaminação situou-se dentro do nível esperado e que a utilização rotineira de procedimentos para o controle microbiológico, pode perfeitamente garantir a qualidade microbiológica necessária para a utilização do leite humano por parte da população infantil atendida pelo Banco de Leite Humano "Anita Cabral".

- Recomenda-se, portanto que o controle microbiológico seja instituído como procedimento de rotina e realizado por amostragem dentro da totalidade das amostras obtidas, instituindo com periodicidade constante e seguindo uma metodologia mínima para a detecção das bactérias possíveis de serem isoladas.

AGRADECIMENTOS

Às doadoras de leite humano que possibilitaram a presente amostragem.

À Direção do BLHAC pela autorização de acesso às instalações, e, em especial, à Dr^a Sonia Maria Galiza

de Carvalho pelo acompanhamento de algumas etapas do trabalho

REFERÊNCIAS

1. Alais, C. *Ciência de la leche Principios de técnica lechera*. México: Companhia Editorial Continental, 1970. 780p.
2. Almeida, J. A. G.; Novak, F. R.; Sandoval, M. H. *Recomendações técnicas para los Bancos de Leche Humana II. Control de calidad Venezolanos. Puericultura y Pediatría*. 61 (1): 12-15, 1998.
3. American Public Health Association – APHA. *Standard methods for the examination of dairy products*. 14th. ed. Washington, 1985.
4. Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT. [NBR 10203] *Preparo da amostra para exame microbiológico*. Rio de Janeiro, 1988, 3p.
5. BARATA, J. O Banco de Leite Humano em 15 anos. *Anais do Instituto Fernandes Figueira*. 01: 41 – 52, 1960.
6. Barros, V.R.M., Panette, J.C., Peres, F.M.C. *Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo – Brasil. Higiene Alimentar*, 03 (3/4): 199-206, set./dez. 1984.
7. Behmer, M.L.A., *Tecnologia do leite: Leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvete e instalações*. 13 ed. São Paulo: Nobel, 1991. 320p
8. Brasil, Ministério da Saúde. *Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico e princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos, II e III. Diário oficial. Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 124, 19 set. 1997, seção 1 e 2, p. 1-30.*
9. Brasil, Ministério da Saúde. *Recomendações para o funcionamento de bancos de leite humano*. 3ª ed. Brasília, DF, 1998.
10. Carvalho, L. *et al.* *Microbiota deteriorante do leite cru de interesse para o processamento de leite longa vida*. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000, Fortaleza. Resumo n.4.27, Fortaleza Ceará 2000. v.1, p.4.27.
11. Ewing, W.H., *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4 ed. Elsevier Science Publishing Co. New York, N. Y., 1986.
12. Fellows, P. *Tecnologia del processado de los alimentos: principio y prácticas*. Zaragoza (Espana): Acribia, 1994.
13. Forsyth, J. S. *Is it worthwhile breast feeding?* Eur. J. Clin. Nutr., 46 (suppl 1): 519 – 525, 1992.
14. Franco, B. D. G., Landgraf, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu: 182p, 1996.
15. Herbert, V., Kasdan, T. S., *What is a healthy food plan?* Cap. 1, In: Herbet, V.; Subak, G. J. (Eds.) *Total Nutrition*, New York, N. Y., 1986.
16. Kriger Van Rij, H.J.W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3 ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984.
17. Kurtzman, C.P., Feel, J.W. *The Yeasts, Taxonomic Study 4ª ed.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998.
18. Laboratório Nacional de Referencia Animal. - LANARA., *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. Brasília, DF: LANARA, v. 1, 1981.
19. Lacaz, C. S., Porto, M. J. E. C. In: *Micologia Médica*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695 p.
20. Leão, R.I. *Higiene do leite: o leite como veiculador de infecções no homem, medidas para assegurar sua inocuidade*. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Comércio, 1973.
21. Lerche, M. *Inspección veterinária de la leche*. Zaragoza: Acribia, 1969.
22. Machado, K. *AMS aprova proposta brasileira de aleitamento*. Rev. Tema. 22: 24 – 28, 2001.
23. Marcondes, E. *Pediatria básica*. 8ª ed. São Paulo: Savier, 1992.
24. Mc Canc; Widdowson's. *The composition of foods*. 4 ed. Amsterdam, Elsevia: North Holland Biomedical Press, 1985.
25. Occhiuzzo, A.R.E.S. *Sistematização da Assistência de Enfermagem ao Lactente* Dissertação 2000. 97 f. (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa PB. 2000.
26. Oliveira, J.S. *Queijos: Fundamentos tecnológicos*. 2 ed. Campinas: UNICAMP, 1986. 146p, (série: Tecnologia de Alimentos).
27. Schimidt, B.J., Eichenberg, J., Santos, M.A.A. *Valor do leite biologicamente acidificado no desenvolvimento bacteriano dos leites reconstituídos em lactários*. Ped. Prot. 51: 53 – 58, 1980.
28. Schimitz, E.M. *et al.* *A enfermagem em pediatria e puericultura*. Rio de Janeiro: Atheneu. 1989. 447 p.
29. Schvartsman, S. *Manual sobre intoxicações alimentares*. Rio de Janeiro: Ed. Dinigraf, 1990.
30. Vanderzant, C., Splitstoesser, R. D. F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3ª ed. Washington: APHA, 1992. 1219p.
31. Veisseyre, R. *Lactologia técnica composicion, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629 p.
32. Versoni, T.C.P., Baruffaldi, R., Colombo, A. J. *Estudo das condições higiênic-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo, Ciên. Tecnol. Alim.* 06: 67 – 74, 1986.

Endereço para correspondência

Prof. Adalberto Coelho da Costa/e-mail: c.adalberto@ig.com.br
Av. Epitácio Pessoa, 4050 Ed. Riviera Aptº. 602 – Miramar
João Pessoa – PB – CEP: 58.039-000

Enteroparasitoses: prevalência nos alunos da Escola Estadual de Carneirinho - MG*

Enteric parasitics: prevalence in students of public school from Carneirinho, MG

Gilmar Machado Lima¹ & Gonçalo de Souza Cotrin²

RESUMO – O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Carneirinho. Neste trabalho foram avaliados 375 amostras de fezes de alunos com idade de 11 a 17 anos, no período de março a junho de 2003. As amostras coletadas foram examinadas pela técnica de Hoffmann¹. O percentual de amostras positivas foram de 55,73% e a de negativas, 44,27%. Os resultados mostraram a ocorrência de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Ancilostomídeos*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, e *Taenia* sp.

PALAVRAS-CHAVE – Carneirinho, enteroparasitoses, prevalência.

SUMMARY – The present study evaluate the prevalence of enteric parasitics in students from Carneirinho's public school. This work appraised 375 samples of children faeces between 11 to 17 years old, from March to June, 2003. The samples were examined by the Hoffman¹ technique. The positive results were 55.73% while the negative ones, 44.27%. The results showed the presence of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Ancilostomides*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis* and *Taenia* sp.

KEYWORDS – Carneirinho, enteric parasitics, prevalence.

INTRODUÇÃO

Dentre os problemas sociais do país encontram-se: a miséria, a falta de acesso ao sistema de saúde e a educação da nossa população. Essas três condições são base para um grave problema de saúde: as enteroparasitoses. Estima-se que estas afetam milhões de pessoas no mundo e são responsáveis por milhares de mortes por ano, atingindo principalmente crianças.

As enteroparasitoses são transmitidas através da água e alimentos contaminados com material fecal; e de pessoa a pessoa, seja em surtos interfamiliares e/ou em pequenas comunidades (rurais, creches, escolas, etc.). A taxa de transmissibilidade é favorecida pelas precárias condições de saneamento básico e higiene. O hábito de higiene é o fator decisivo no controle das parasitoses intestinais. Este trabalho teve como objetivo verificar a prevalência dos parasitos intestinais nos alunos da Escola Estadual "Bom Sucesso" de 1º e 2º graus - Carneirinho - Minas Gerais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fase pré-analítica: Inicialmente foram feitos o cadastro e coleta de dados de todos os alunos matriculados na escola. Durante o período março a junho de 2003, foram realizados 375 exames parasitológicos de fezes (EPF) envolvendo alunos de 5ª série do Ensino Fundamental à 3ª série do Ensino Médio na faixa etária de 11 a 17 anos.

Às 2^{as} feiras dirigíamos até a sala de aula e comentávamos as causas, efeitos, conseqüências e prevenções das enteroparasitoses. Em seguida cada aluno recebia 01 kit de material descartável compostos de: coletor universal não estéril com solução conservadora (formalina 10%) e três espátulas, juntamente com um folheto explicativo dos procedimentos de coleta tripla em dias diferentes. Nas 6^{as} feiras eram recolhidos em sala de aula os potes contendo os materiais biológicos fecais e conduzidos até o laboratório.

Fase analítica: No laboratório todas as normas e procedimentos de rotinas (inclusive o controle de qualidade) eram seguidos e executados rigorosamente, usando o método de sedimentação espontânea Hoffmann¹. No sedimento analisado constatava-se presenças ou ausências de cistos, ovos e/ou larvas de parasitos.

Fase pós-analítica: Com a validação dos resultados, os laudos foram impressos em 2 vias. Depois de conferidos e assinados, a 1ª via do laudo era lacrada e entregue ao aluno em sala de aula. Os pacientes constatados com a presença de parasitos foram encaminhados até a Unidade Básica de Saúde para o correto tratamento. A 2ª via do laudo juntamente com os dados brutos gerados foram arquivados separadamente por série.

Todos os 619 alunos matriculados receberam o kit para coleta. Destes, participaram da pesquisa 375 alunos (60,58%). Os demais 294 (39,42%) se abstiveram.

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

*Trabalho realizado pelo laboratório Gilmar Machado Lima & Melo S/C Ltda - Carneirinho/MG
¹Proprietário, Responsável Técnico e Diretor Clínico do Laboratório; ²Professor de Biologia

TABELA I
Frequência dos parasitos, segundo o sexo

Sexo	Negativo	Positivo	Total	Frequência (%)	Ausência (%)
Masculino	80	104	184	56,52	43,48
Feminino	86	105	191	54,97	45,03
Total	166	209	375	55,73	44,27

TABELA II
Prevalência das enteroparasitoses, bi e poliparasitismo nos casos positivos

Parasitos	Casos positivos	Frequência (%)
Cistos de <i>Giardia lamblia</i>	58	27,75
Cistos de <i>Entamoeba coli</i>	05	2,39
Cistos de <i>Entamoeba histolytica</i>	21	10,02
Ovos de Ancilostomídeos	60	28,70
Ovos de <i>Enterobius vermicularis</i>	16	7,65
Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	03	1,43
Ovos de <i>Taenia</i> sp	01	0,48
Larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i>	09	4,30
Cistos <i>G. lamblia</i> + Ovos Ancilostomídeos	04	1,92
Cistos <i>G. lamblia</i> + Ovos de <i>Enterobius</i>	02	0,96
Cistos <i>G. lamblia</i> + <i>E. histolytica</i>	04	1,92
Cistos <i>G. lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>E. coli</i>	02	0,96
Cistos <i>G. lamblia</i> + Larvas <i>S. stercoralis</i>	02	0,96
Cistos <i>E. histolytica</i> + Ovos Ancilostomídeos	09	4,32
Cistos de <i>E. coli</i> + Ovos Ancilostomídeos	02	0,96
Cistos de <i>E. histolytica</i> + Ovos <i>Enterobius</i>	02	0,96
Cistos de <i>E. histolytica</i> + Cistos <i>E. coli</i>	06	2,88
Cistos de <i>G. lamblia</i> + <i>E. coli</i>	01	0,48
Larvas <i>S. stercoralis</i> + Ovos Ancilostomídeos	01	0,48
Ovos de <i>A. lumbricoides</i> + Ancilostomídeos	01	0,48
TOTAL	209	100,00

RESULTADOS

Das 375 amostras de materiais biológicos fecais analisadas, 209 (55,73%) foram positivas e 166 (44,27%) negativas. Os parasitos mais frequentes foram: Ancilostomídeos (28,70%) e *Giardia lamblia* (27,75%).

A frequência de parasitos que acometem os jovens segundo o sexo, são mostrados na Tab. I.

A prevalência das enteroparasitoses dos casos positivos, bem como o bi e o poliparasitismo intestinal, ou seja, a presença simultânea de duas ou mais espécies de parasitos são mostrados na Tab. II.

DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

1. Os resultados apresentados neste trabalho, demonstram a importância do monitoramento das enteroparasitoses, para melhor avaliação do perfil epidemiológico em nosso meio. Observa-se que a incidência dos parasitos cuja transmissão se dá por via oral, veicula-

dos através d'água, alimentos mal preparados e conservados, são mais comuns nas regiões tropicais e em população mais carentes em função das precárias condições de saneamento básico e higiene².

2. Foi evidenciada, pelos estudos, a presença de protozoários e metazoários. As ausências ou baixos índices de incidência de certos parasitos intestinais podem estar subestimados, propiciando diagnósticos falsos negativos, devido:

- os casos de leve infestação e/ou infecção;
- características do método usado, que não se mostra o mais indicado;
- por peculiaridades biológicas do ciclo do parasita;

3. A incidência maior foi nos participantes do sexo masculino.

4. O parasitismo e o poliparasitismo têm uma prevalência maior nos alunos que residem na zona rural. Assim se confirma que a melhor qualidade de vida, refletida por boas condições de moradia, alimentação, saneamento básico, acesso a informações e assistência médica, são fatores determinantes para a baixa infecção por protozoários e a infestação por metazoários nas classes sociais mais favorecidas.

5. Vários alunos fizeram exames de fezes pela primeira vez.

6. Não participaram da pesquisa 244 (39,42%) alunos por: desinteresse, vergonha, timidez, omissão ou indiferença.

7. Dos alunos participantes 110 (29,33%) residem na zona rural, onde não possuem abastecimento de água tratada e rede de esgoto.

8. Com a elevada prevalência de enteroparasitoses, sugere-se a implementação e a persistência de um programa de educação continuada, envolvidas em diferentes regiões do país, de modo que evoluam os estudos, visando medidas de prevenções.

AGRADECIMENTOS

Os pesquisadores agradecem a cooperação, a participação e o incentivo por parte da instituição de ensino: direção, secretaria, professores, servidores, colaboradores e alunos; também, todos os integrantes da Unidade Básica de Saúde, que de forma direta ou indireta nos proporcionaram as condições ideais para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Hoffmann, N.A.; Fons, J.A.; Janer, J.L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni, J. Public Hith, v.9:283-91, 1934.
- Coelho, L.M.P.S.; Sobrinho, T.A.; Oliveira, S.M.; Rev. Soc. Brás. Méd. Trop. V.32:647-652, 1999.
- Camillo-Coura, L. Contribuição à profilaxia das geohelmintíases. Ver. Soc. Brás. Méd. Trop. VII (6): 341-356, 1974.
- De Carli G.A.; Parasitologia Clínica, Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas, 1ª edição ed. São Paulo, Atheneu, 2001.
- Neves, D.P.; Parasitologia humana, 8ª edição ed. São Paulo, Atheneu, 1991.

Endereço para correspondência

Dr. Gilmar Machado Lima
 Laboratório de Análises Clínicas Lima Ltda
 Rua José Ambrósio de Queiroz, 976 - Centro - Carneirinho - MG - 38.290-000
 Fone/Fax: (0xx34)3454-1163
 E-mail: limlab.drogaria@netsite.com.br

Cristalúria como um método auxiliar de investigação de pacientes litíasicos: uma experiência na Região Metropolitana de Fortaleza*

Cristalluria like method of lithiasis investigation in patients: an experience in the metropolitan region of Fortaleza

Sônia Leite da Silva^{1,2}, Sílvia Fernandes Ribeiro da Silva^{1,2}, Rafael Bezerril Nogueira¹, Wanda Maria Azeredo Demoraes Campos¹, Ailson Gurgel Fernandes¹ & Henry de Holanda Campos¹

RESUMO – Objetivo: Identificar, através da cristalúria, os cristais mais freqüentemente observados em portadores de litíase urinária, na Região de Fortaleza. *Materiais e Métodos:* 755 cristalúrias proveniente de 464 pacientes, 51,3% masculino, idade de $32,1 \pm 1,2$ anos, no período de 1993 a 1996. *Resultados:* A chance de cristalúria positiva nesta população variou de 34,6% a 41,6%. Nos pacientes litíasicos, a cristalúria mostrou uma sensibilidade de 40,7% e especificidade de 63,9%. Os cristais mais freqüentemente, em ordem decrescente: COD, COM, AUD, PACC, bruxita e estruvita. *Conclusão:* Nossos resultados sugerem que oxalato e ácido úrico podem desempenhar um importante papel na patogênese dos cálculos urinários nesta Região.

PALAVRAS-CHAVE – Cristalúria, litíase urinária, oxalato de cálcio, ácido úrico.

SUMMARY – Objective: The present study shows how to identify possible risk factors to development of urinary stones in Fortaleza. *Materials and Method:* 755 determinations of crystalluria were performed in 464 patients, 51.3% male, $32,1 \pm 1,2$ years between 1993-1996. *Results:* The probability to find a positive crystalluria in this population varied from 34.6% to 41.6%. In patients with nephrolithiasis, crystalluria showed 40.7% of sensibility and 63.9% of specificity. The crystals more often observed were COD, COM, dihydrate uric acid, PACC, brushite, cystine and struvite. *Conclusion:* Our findings suggest that oxalate and uric acid gets an important role in the pathogenesis of urinary stones in this Region.

KEYWORDS – Crystalluria, nephrolithiasis, calcium oxalate, uric acid.

INTRODUÇÃO

A litíase urinária determina uma significativa morbidade e representa elevado custo social. Estudos epidemiológicos mostram que mais de 1 milhão de pessoas nos EUA, 2 milhões na França e mais de 25 milhões na Europa são acometidas.^{1,2} Com base em dados estatísticos, tem sido estimado que aproximadamente 12% dos homens e 5% das mulheres poderão formar cálculo urinário ao longo da vida.³ O aumento na freqüência desta patologia, observado nos últimos anos, pode estar relacionado a hábitos alimentares, como o aumento na ingestão de proteína animal e o consumo de alimentos ricos em oxalato e sódio. Não havendo relatos de estudos realizados no Estado do Ceará para detectar fatores envolvidos na formação de cálculos urinários, foi o presente estudo desenvolvido com o intuito de identificar estes fatores, utilizando a cristalúria como método de investigação.

MATERIAIS E MÉTODOS

População

Trata-se de um estudo transversal onde foram analisadas 755 cristalúrias provenientes de 464 pacientes, sendo 238 (51,3%) do sexo masculino, com média de

idade de 32,1 anos (3 meses a 75 anos) e erro médio padrão de 1,2. Os exames foram realizados no período de setembro de 1993 a setembro de 1996. Informação sobre o quadro clínico que motivou a solicitação da cristalúria pôde ser obtida em 719 amostras.

Métodos

A primeira urina matinal, obtida em jejum, foi analisada até 2 horas após a emissão, sendo também determinados volume, pH e densidade. O pH urinário foi medido utilizando fita com variação de 0,3 unidades (Duotest®). Após homogeneização manual da urina, uma alíquota retirada do quarto inferior do frasco e colocada em Célula de Malassez foi examinada através de microscopia óptica com luz polarizada (Nikkon) para a pesquisa de cristais. Os diferentes tipos de cristais, suas formas e agregados foram avaliados, medidos e quantificados. Aqueles em forma de grânulos foram avaliados de forma semiquantitativa.

Análises estatísticas

Tabelas de contingência para as variáveis discretas foram analisadas através do teste Qui-quadrado de Pearson, para teste de homogeneidade e de independência. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste

Recebido em 3/10/2003
Aprovado em 18/2/2004

¹Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais (CPDHR), Universidade Federal do Ceará, Brasil. ²Universidade de Fortaleza – UNIFOR.
³Laboratório de Cristalúria do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais – UFC.

F da análise de variância para um fator. Os intervalos de confiança para as proporções foram calculados com 95% de confiança, segundo a fórmula:

$$p \pm 1,96 \times \sqrt{(p \times q/n)}$$

onde $q=1-p$ e n =número da amostra. Os resultados são expressos como média \pm erro médio padrão.

RESULTADOS

A presença de cristais foi detectada em 288 das 755 amostras de urinas, o que representa uma chance global de positividade entre 34,6% e 41,6%, com um coeficiente de confiança de 95%. Em 141 amostras (18,7%), havia referência ao uso de medicação específica para correção de algum distúrbio metabólico; em 350 (46,3%) não dispúnhamos de tal informação. A Tab. I mostra as diversas situações clínicas que motivaram a solicitação da pesquisa de cristalúria, com as respectivas chances de positividade: 423 amostras de urina provenientes de indivíduos litíasicos, 52 de indivíduos com dor lombar sugestiva de litíase sem comprovação clínica ou radiológica, 68 de transplantados renais, 48 de potenciais doadores de rim, 18 de pacientes com hematúria, 75 amostras decorrentes de investigação familiar de litíase e 72 de outras situações diversas. Cristais urinários foram detectados em todos os grupos, com maior

TABELA I
Distribuição da frequência de amostras com cristalúria positiva de acordo com os grupos clínicos estudados

Grupos Clínicos	Cristalúria positiva	Cristalúria positiva
	n° de pacientes do grupo	n° de pacientes totais
	n (%)	n (%)
nefrolitíase	172/423 (40,7%)	172/755 (22,8%)
Dor lombar	15/52 (28,8%)	15/755 (2%)
Receptores de transplante renal	28/68 (41,2%)	28/755 (3,7%)
Doador renal	14/48 (29,2%)	14/755 (1,9%)
hematúria	3/18 (16,7%)	3/755 (0,4%)
Investigação familiar	21/75 (28%)	21/755 (2,8%)
Outros	13/36 (36,1%)	13/755 (1,7%)
Não identificado	22/36 (61,1%)	22/755 (2,9%)
Total	288	288/755* (38,1%)

*1 paciente submetido a transplante renal também apresentou nefrolitíase

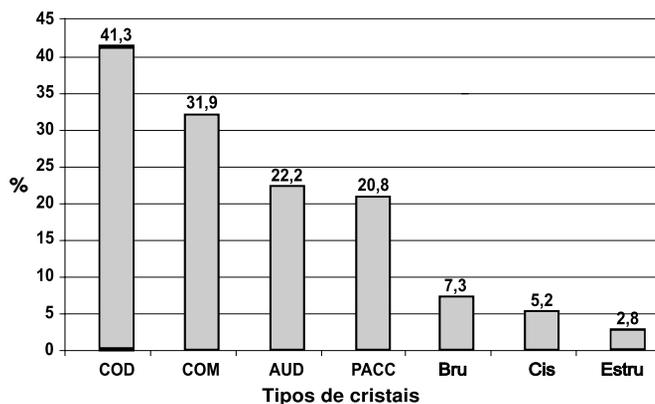


FIG. 1 - Distribuição de frequência das espécies cristalinas observadas em 288 amostras de urina.

frequência nos pacientes litíasicos (40,7%), o que representa uma especificidade de 63,9% (58,3-69,5%). É interessante ressaltar que 14 dos 48 (29,2%) indivíduos candidatos a doação renal para transplante apresentavam cristalúria positiva. Não houve diferença entre estes grupos em relação a idade, pH e densidade urinária.

A densidade urinária das amostras com cristalúria positiva foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que a daquelas com cristalúria negativa ($1017 \pm 0,4$ e $1014 \pm 0,3$, respectivamente). Das 288 amostras de urina positivas, 167 (58%) eram provenientes de indivíduos do sexo masculino e 121 (42%) do feminino, enquanto que das 467 amostras negativas, 216 (46%) eram do sexo masculino e 251 (54%) do feminino ($p=0,0073$, g.l.=1). Não houve diferença significativa em relação à idade, volume e pH urinário.

A Fig. 1 mostra a distribuição das espécies de cristais presentes nas 288 amostras de urina: oxalato de cálcio dihidratado-COD (41,3%), oxalato de cálcio monohidratado-COM (31,9%), ácido úrico dihidratado-AUD (22,2%), fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo-PACC (20,8%), bruxita-Bru (7,3%), cistina-Cis (5,2%) e estruvita-Estru (2,8%). Em 10% das amostras, o tipo de cristal não pôde ser determinado devido ao seu pequeno tamanho ou a inabitual forma de apresentação. Associação de espécies cristalinas foi encontrada em 31% das amostras, sendo a mais freqüente a de COD+COM (48,4%), seguido de COM+COD+AUD (7,9%). Na Fig. 2 observa-se que os cristais de COD, COM e de cistina predominaram no sexo masculino (60,5%, 60,9%, 78,9%, respectivamente; $p < 0,05$).

As amostras de urina de indivíduos candidatos a doação renal para transplante apresentaram uma positividade de 1,9% em relação à amostra global e 29,2% em relação ao número de candidatos avaliados. Neste grupo foram observados cristais de PACC em 7 amostras (53,8%), cristais de COD em 5 (38,5%), de COM em 4 (30,8%), de bruxita em 1 (7,7%), em 4 amostras mais de uma espécie cristalina foi encontrada. Em 7 das 13 amostras havia formação de agregados.

Os cristais de COM e COD apresentaram tamanho inferior a 10μ em 67,5% e 71,8% das amostras, e maior do que 40μ em 3,4% e 1,9%, respectivamente. Oito formas de cristais de COD foram detectadas na urina, a mais freqüente a forma bipiramidal (90%) e a menos freqüente a dodecaédrica (3,4%). Em 66% das amos-

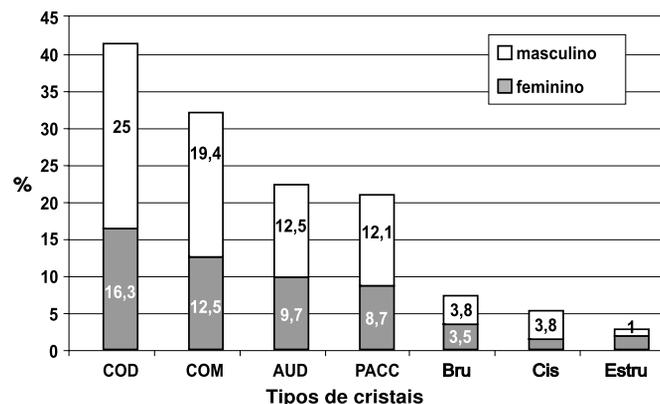


FIG. 2 - Distribuição das espécies cristalinas observadas em 288 amostras, de acordo com o sexo.

Legenda: Oxalato de cálcio dihidratado-COD; oxalato de cálcio monohidratado-COM; ácido úrico dihidratado-AUD; fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo-PACC; bruxita-Bru; cistina-Cis e estruvita-Estru.

tras os cristais de COM se apresentavam com forma oval e em 43,5% com forma hematiforme.

DISCUSSÃO

Pelo fato da cristalização representar um passo inicial e obrigatório na formação de cálculos urinários, a pesquisa de cristalúria foi escolhida para investigar fatores que poderiam influenciar na cristalogênese de indivíduos litiásicos ou não da região de Fortaleza. Além disso, a presença de cristais urinários também pode fornecer indícios sobre o estado de saturação da urina, sendo útil para a avaliação de pacientes litiásicos. A frequência de cristalúria positiva varia de acordo com o grupo de indivíduos analisados. Em indivíduos normais ou em população não selecionada varia de 2 a 22%; em pacientes litiásicos a frequência se eleva para valores entre 22 e 59%.^{4,9} Na nossa casuística, a chance de encontrar cristais na urina variou de 34,6 a 41,6%. No entanto, esta população engloba diversas categorias de indivíduos. Quando analisamos os pacientes com litíase urinária comprovada, encontramos uma especificidade mais elevada da cristalúria. Verificamos na nossa população, uma influência da densidade urinária e do sexo masculino na positividade da cristalúria. A presença de cristais foi significativamente maior nas amostras com densidade urinária mais elevada ($p < 0,001$). Como relatado por Cottet e cols., a ausência de cristais em urina com densidade superior a 1025-1035 sugere saturação urinária normal.¹⁰ Não dispomos de explicação para a maior prevalência de cristais no sexo masculino, mas poderia ser justificado pela maior incidência da litíase urinária nos homens, com proporção relatada de 2 a 3 homens para cada mulher.¹¹

Daudon e cols., numa análise de 7000 amostras de urina, evidenciaram cristais de estruvita como os mais frequentes (34%), seguidos de cristais de COD (33%), PACC (23%), AUD (11%), COM (8%), bruxita (3%) e, raramente, de cistina.^{4,12} Hallson e cols. também relataram um predomínio de cristais de fosfato de cálcio, tanto em indivíduos normais (11%) quanto em litiásicos (32%). Neste estudo, os cristais de oxalato de cálcio foram observados em 12% das amostras de urina de pacientes litiásicos e em 9% daquelas de indivíduos normais.⁵ Nossa casuística mostra que a maioria dos cristais detectados foi de oxalato de cálcio, com predominância da forma dihidratada (41,3%) sobre a monohidratada (31,9%). Do mesmo modo, nas amostras com mais de uma forma de cristal, predominou a associação destas duas formas. Os cristais de fosfatos de cálcio representam a 4ª espécie mais frequentemente encontrada, a maioria na forma de fosfato amorfo. É interessante ressaltar uma elevada frequência de cristais de AUD (22,2%), comparada com aquela descrita na literatura, onde os valores têm variado de 3,6% a 11,6%.^{4,7,8,12} Ribeiro e cols., analisando 41 crianças portadoras de litíase renal em Fortaleza, mostraram que a hiperuricosúria foi o distúrbio metabólico mais frequente, ocorrendo em 56,3% dos casos (7ª Jornada de Nefrologia Pediátrica 1993; pp 64).

A cistinúria é uma doença relativamente rara e a presença de cristais tem sido relatada ser de 1%.¹² A elevada frequência destes cristais na nossa amostra pode ser explicada pela investigação familiar de indivíduos portadores desta patologia, através da cristalú-

ria. Em relação à forma e tamanho dos cristais de COD, nossos dados são semelhantes aos da literatura, mostrando que a maioria deles está na forma bipiramidal e com tamanho inferior a 12mm.^{13,15} Entretanto, há divergências em relação à distribuição das formas segundo o sexo. Nosso estudo mostrou uma predominância do sexo masculino em ambas as formas de cristais, enquanto Daudon e cols. relataram um predomínio da forma monohidratada no sexo feminino e igualdade de frequência entre os sexos na forma dihidratada.^{4,8}

Cristais tem sido observados na urina de indivíduos normais, principalmente os de COD na forma bipiramidal e os de fosfato de cálcio.^{5,8,9} Em nosso estudo, 14 dos 48 candidatos à doação para transplante renal apresentavam cristais de oxalato ou fosfato de cálcio, sendo que em 4 deles foi detectado mais de um tipo de cristal e em 7 (53,8%) havia formação de agregados.

Este é o primeiro estudo realizado no Nordeste visando identificar, através da análise da cristalúria, possíveis fatores litogênicos. Os resultados observados sugerem que oxalato e ácido úrico podem desempenhar um importante papel na fisiopatogenia da litíase urinária nesta população. É possível que uma ingestão com reduzido teor em cálcio, numa região abastecida por água branda, favoreça a absorção de oxalato intestinal. Por outro lado, a ingestão abundante de peixes, frutos-do-mar e vísceras aumentaria a excreção de ácido úrico. Sugerimos, portanto, que fatores ambientais e nutricionais sejam responsáveis pelas peculiaridades observadas no processo de cristalização em nossa Região.

REFERÊNCIAS

1. Johnson C.M., Wilson D.M., O'Fallon W.M., Malek R.S., Kurland L.T. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int.* 16: 624-31. 1979.
2. Sierakowski R., Finlayson B., Landes R.R., Finlayson C.D., Sierakowski N. The frequency of urolithiasis in hospital discharge diagnosis in the United States. *Invest. Urol.* 15: 438-41. 1978.
3. Smith L.H. The medical aspects of urolithiasis: na overview. *J. Urol.* 141: 707-10. 1989.
4. Daudon M., Protat M.F., Réveillaud R.J., Rouchon M. Étude de la cristallurie spontanée par spectroscopie infrarouge. Recherche de corrélations entre les cristaux, les calculs, les germes et les sexe des malades. *Ann. Biol. Clin.* 41: 199-207. 1983.
5. Hallson P.C., Rose G.A. Crystalluria in normal subjects and in stone formers with and without thiazide and cellulose phosphate treatment. *Br. J. Urol.* 48: 515-24. 1976.
6. Elliot J.S., Rabinowitz I.N., Silvert M. Calcium oxalate crystalluria. *J. Urol.* 116: 773-5. 1976.
7. Abdel-Halim R.E. Crystalluria and its possible significance. A patient-control study. *Scand J. Urol. Nephrol.* 27: 145-9. 1993.
8. Nguyen H.V., Daudon M., Réveillaud R.J., Jungers P. Étude de la cristallurie spontanée chez les lithiasiques oxalo-calciques. *Néphrol.* 8: 65-9. 1987.
9. Hallson P.C., Rose G.A. Measurement of calcium phosphate crystalluria: influence of pH and osmolality and invariable presence of oxalate. *Br. J. Urol.* 64: 458-62. 1989.
10. Cottet J., Vittu C. Sédiment et lithiase urinaire. *Presse Med.* 34: 703-4. 1953.
11. Jungers P. Épidémiologie de la lithiase urinaire. In: Jungers P, Daudon M, Alain Le Duc, editors. *Lithiase Urinaire*. 1^{ère} ed. Paris: Médecine-Science Flammarion; 1989. p.1-34.
12. Daudon M. Crystallurie I. Aspects pratiques et interprétation. *Feuillets de Biologie.* 28: 25-40. 1987.
13. Robertson W.G., Peacock M., Nordin B.E.C. Calcium crystalluria in recurrent renal-stone formers. *Lancet.* 5: 21-4. 1969.
14. Crassweller P.O., Brandes L., Katirtzoglou A., Oreopoulos D.G. Studies of crystalluria in recurrent calcium lithiasis. *Can. J. Surg.* 22(6): 527-9. 1979.
15. Elliot JS, Rabinowitz. Calcium oxalate crystalluria: crystal size in urine. *J. Urol.* 123: 324-7. 1980.

Endereço para correspondência

Sônia Leite da Silva
Av. dos Expedicionários nº 5405, Bloco 9, apartamento 301
Fortaleza, Ceará,
CEP 60.410-410
E-mail: silviafrs@baydenet.com.br

Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos*

Cytotoxicity studies of okadaic acid on human lymphocytes and its mitogenic effect

Telma Maria Araújo Silva¹, Hiroshi Aoyama², Marcela Haun² & Carmen Veríssima Ferreira²

RESUMO – Proteínas fosfatases são moléculas sinalizadoras que agem juntamente com as proteínas quinases para regular uma variedade de processos celulares fundamentais, bem como, crescimento celular, mitogênese, metabolismo, transcrição de gene, ciclo celular e resposta ao estresse e imune. O ácido okadáico é um potente e específico inibidor de proteína serina/treonina fosfatase (PP1 e PP2A). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citotóxico do ácido okadáico na viabilidade de linfócitos humanos e sua ação mitogênica. Nos estudos de citotoxicidade avaliamos o efeito do ácido okadáico através dos seguintes parâmetros: redução do MTT (integridade mitocondrial), conteúdo total de proteínas (número de células) e atividade fosfatásica (metabolismo celular). O valor para redução do MTT e atividade fosfatase foram : 50nM e 100nM, respectivamente; não foi encontrado valor de IC₅₀ para o conteúdo de proteína. A atividade fosfatásica não foi afetada pelo ácido okadáico (100nM) quando este composto foi adicionado no extrato celular. A proliferação de linfócitos foi estimulada em 25% quando as células foram tratadas com o ácido okadáico durante o plaqueamento e na ausência da fitohemaglutinina (mitogênico). O estímulo máximo foi até 30 minutos. O ácido okadáico não foi citotóxico para os linfócitos. A ação mitogênica deste composto foi confirmada pelo conteúdo de proteína.

PALAVRAS CHAVE – Ácido okadáico, citotoxicidade, linfócitos e proteína fosfatase.

SUMMARY – Protein phosphatases are signaling molecules that act in concert with protein kinases to regulate a variety of fundamental cellular processes such as cell growth, mitogenesis, metabolism, transcription gene, cell cycle immune and stress responses. Okadaic acid is a potent, specific inhibitor of protein serine/threonine phosphatase (PP1 and PP2A). The aim of this study was to evaluate the effect of okadaic acid on lymphocyte viability and mitogenic effect. The cytotoxicity studies of okadaic acid on human lymphocytes were evaluated through three endpoints of cytotoxicity: MTT reduction (mitochondrial function), protein content (cell number indication) and phosphatase activity (cell metabolism). The IC₅₀ values for MTT reduction and phosphatase activity were : 50nM and 100nM, respectively; no IC₅₀ could be calculated for the change in protein content. Phosphatase activity was not affected by okadaic acid (100nM) when this compound was added to the cell extract. Lymphocyte proliferation was stimulated 25% when the cells were treated with okadaic acid during plating and in the absence of phytohemagglutinin (mitogen). This stimulation was maximal after 30 min. Okadaic acid was not cytotoxic to lymphocytes. The mitogenic action of this compound was confirmed in total protein content.

KEYWORDS – Okadaic acid, cytotoxicity, lymphocytes, protein phosphatase.

INTRODUÇÃO

O ácido okadáico (OKA) (Fig. 1) é um poliéster natural, produto isolado originalmente da esponja marinha *Halichondria okadai* (Daranas *et al.*, 2001). É um potente inibidor das proteínas serina/treonina fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A).

Este composto é conhecido como promotor de tumor, por alterar a proliferação de alguns tipos celulares, como por exemplo, células epiteliais. A ação como promotor de tumor do OKA é explicado pela inibição de proteínas Ser/Thr fosfatases PP1 (IC₅₀ 54 - 160nM) e PP2A (0.06 - 0.88nM) e ativação da proteína quinase C, independente do diacilglicerol (Zheng *et al.*, 1991), conseqüentemente, sendo extremamente utilizado como ferramenta para se estudar processos celulares regulados por desfosforilação envolvendo estas enzimas (Ishihara *et al.*, 1989b; Eriksson *et al.*, 1990a; Honkanen, 1993; Holmes & Boland)

As proteínas fosfatases são classificadas: proteínas serina/treonina fosfatase e proteínas tirosina fosfatase de acordo com o substrato específico, dependência de metais para catálise e sensibilidade a agentes inibidores ou ativadores (Zhang *et al.*, 2002).

Proteínas serina/treonina fosfatases são divididas em sete subtipos: PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP5, PP6 e PP7 (Harrison

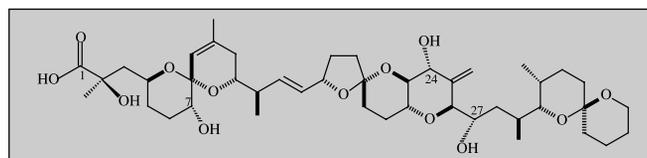


FIG. 1 - Estrutura química do ácido okadáico.

et al 1999). O principal tipo de Serina/Treonina fosfatase é a PP1, com massa molecular de 37kDa, que tem um importante papel em vários processos celulares do ponto de vista genético, farmacológico e bioquímico. Mutações na PP1 levam a defeitos na mitose, meiose, integridade celular e no metabolismo do glicogênio (Lin *et al.*, 1999).

Ensaios *in vitro* em cultura de células são usados para avaliar a relação entre o efeito terapêutico versus toxicidade. Numerosas técnicas *in vitro* foram desenvolvidas para avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade de drogas (Tardiff, 1978).

Existem diversas técnicas para análise da citotoxicidade *in vitro* que permitem com maior rapidez a identificação de compostos tóxicos e podem ser utilizadas para os estudos de mecanismos de toxicidade em nível celular e subcelular (Delraso, 1993; Loveland *et al.*, 1992). Testes de viabilidade mais utilizados em cultura de células são: Vermelho Neutro

Recebido em 6/4/2004
Aprovado em 28/7/2004

*Prêmio SBAC, XXI CBAC, 2004, Salvador, BA

¹Docente do Deptº de Análises clínicas e Toxicológicas, Lab. de Bioquímica Clínica, Faculdade de Farmácia, Univ. Fed. do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN;
²Docentes do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Univ. Est. de Campinas (UNICAMP), CP 6110, Campinas, SP, 13081-970, Brasil.

- avalia a integridade da membrana lisossomal (Renzi *et al.*, 1993); Redução do MTT – MTT [brometo de (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazolio)] analisa a integridade mitocondrial baseada na redução enzimática do corante pelas desidrogenases mitocondriais (Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986); Conteúdo de Ácidos Nucléicos e dosagem de proteínas - dão indicativo do número de células (Cingi *et al.*, 1991); Azul de Tripán - integridade das membranas pois células viáveis excluem este corante (Renzi *et al.*, 1993); dosagem da atividade de fosfatases - fornece indicação do metabolismo celular (Aoyama *et al.*, 2000).

Os linfócitos são células de defesa importantes para a análise celular e molecular de eventos durante a resposta imune, o propósito deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* do ácido okadaico em cultura primária de linfócitos humanos e sua possível ação mitogênica sobre estas células.

MATERIAL E MÉTODOS

• Obtenção dos linfócitos

Os linfócitos foram obtidos do sangue humano conforme aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, processo de nº 311/2000. O sangue foi coletado de voluntários saudáveis com idade entre 18 e 40 anos de idade e que não estavam fazendo uso de medicamentos, fumo e álcool. O sangue foi coletado da veia antecubital entre 7:00 e 10:00 horas da manhã em tubos heparinizados e em condições estéreis.

• Isolamento dos linfócitos do sangue total

O sangue total coletado foi homogeneizado por inversão e diluído com solução fisiológica com meio de cultura RPMI não suplementado para os experimentos realizados em cultura de células, na proporção 1:1 (v/v). O sangue diluído (7mL) foi colocado lentamente em um tubo de centrifuga contendo 3mL de Ficoll-Paque™ Plus e centrifugado por 30 min a 1000g refrigerado a 4°C. Em seguida, a nuvem linfocitária foi retirada com pipeta Pasteur e lavada 2 vezes com meio de cultura RPMI 1640 não suplementado. Então, os linfócitos foram utilizados para a cultura de células.

• Cultura primária de linfócitos humanos e ensaios de linfoproliferação

Os linfócitos obtidos descritos anteriormente foram plaqueados numa densidade de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços (Corning®) e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell®), antibióticos 100 IU/mL (estreptomicina e penicilina) e fitohemaglutinina 5µg/mL (mitógeno). Os linfócitos foram incubados em estufa (Formal Científica®) a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas ou nos tempos indicados nas figuras. Após estes tempos, o meio foi substituído por um novo meio contendo o ácido okadaico e incubados por 24 horas nas condições citadas acima. Após o tratamento das células, foram utilizados os seguintes parâmetros para avaliar a viabilidade celular: atividade fosfatásica (405nm), conteúdo de proteínas totais (660nm), atividade mitocondrial pela redução do MTT (570nm) e exclusão do corante azul de tripan.

• Determinação da atividade fosfatásica

Dosagem do p-nitrofenol – A dosagem da atividade fosfatásica foi determinada utilizando-se 5mM de p-nitrofenilfosfato (pNPP). Para a lise celular foi usado tampão acetato de sódio 1mM pH 5,0. O meio de reação (volume final, 1,0mL) continha tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5, 5mM de p-NPP e a enzima. Depois de 40 minutos de incubação a 37°C em banho-maria, a reação foi paralisada pela adição de 1,0mL de NaOH 1M.

A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada pela medida da absorbância a 405nm (Aoyama *et al.*, 2000).

Dosagem de proteínas totais – A proteína foi quantifi-

cada pelo método de Lowry como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2mL do reagente C a 0,2mL da amostra. Após 10 min, adicionou-se 0,2mL do reagente Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato/fosfotungstato diluído 1:1 em água milílica). A leitura da absorbância foi feita a 660nm após 30 min da adição do reagente Folin-Ciocalteu à temperatura ambiente.

- Reagente A: Carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1M;
- Reagente B: CuSO₄·5H₂O 0,5% em citrato de sódio 1%;
- Reagente C: 1mL do reagente B + 50mL do reagente A;
- Reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em H₂O).

• Avaliação da função mitocondrial pela redução do MTT

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma®) pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. Este produto é acumulado dentro da célula e extraído através da adição de um solvente apropriado. Após incubação de 24 horas das células com os compostos, o meio de cultura foi substituído por outro sem soro fetal bovino contendo o corante MTT (1mg/mL). As células foram incubadas durante 3 a 4 h (37°C) que é o tempo necessário para a redução deste corante. Em seguida o meio foi retirado cuidadosamente sendo adicionado 1mL de etanol P.A. para solubilização do formazan. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de placas a 570nm. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (Mosmann, 1983, Denizot & Lang, 1986).

• Exclusão do azul de tripan

Após a retirada das células que foram mantidas em cultura, uma pequena alíquota de 50µl da suspensão de células foi misturada com 0,05% (v/v) azul de tripan. (Sigma®) As células viáveis que excluíram este corante foram contadas na câmara de Neubauer (0,100 mm) (Loveland *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1992).

Estatística: todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados mostrados representam a média ± desvio padrão.

RESULTADOS

A Fig. 2 nos mostra que o ácido okadaico causou uma diminuição dose dependente no metabolismo mitocondrial, na atividade fosfatásica e no conteúdo protéico dos linfócitos humanos, com valor de IC₅₀ de 47 e 100nM para redução do MTT e atividade fosfatásica, respectivamente, e o conteúdo total de proteína diminuiu apenas 20% na concentração de 100nM desta toxina, isto quando incubamos por 24 horas os linfócitos humanos com o ácido okadaico.

Esta toxina exerce efeito mitogênico nos linfócitos hu-

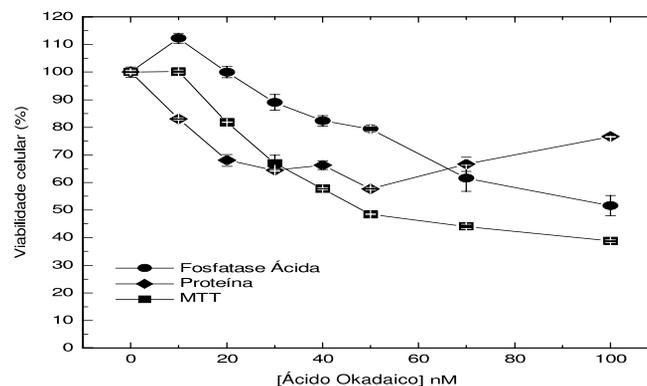


FIG. 2 - Efeito do ácido okadaico na viabilidade celular dos linfócitos humanos. Atividade fosfatásica (●); Conteúdo protéico (▲) e redução do MTT (■), estes parâmetros foram determinados após 24 horas de incubação com o ácido okadaico. Cada ponto analisado representa a média ± SD dos três experimentos.

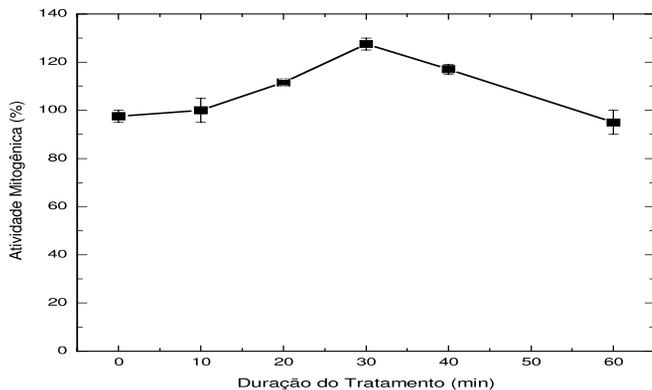


FIG. 3 - Efeito do ácido okadáico na proliferação dos linfócitos humanos. As células foram tratadas com o ácido okadáico (100nM) na ausência e presença do mitogênico (Fito hemaglutinina) nos diferentes tempos, após estes tempos a viabilidade celular foi determinada na presença do azul de tripan.

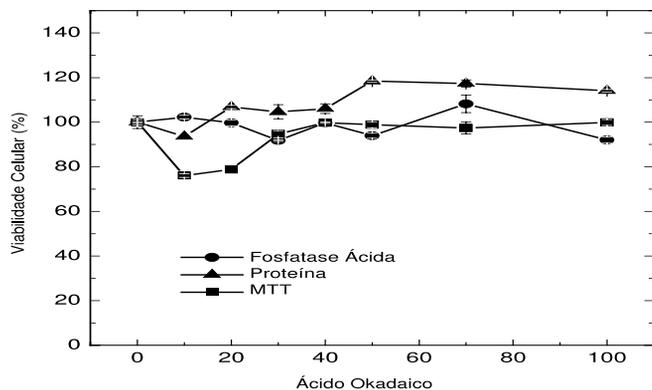


FIG. 4 - Efeito do ácido na viabilidade dos linfócitos humanos. Atividade fosfatásica (●); Conteúdo protéico (▲) e redução do MTT (■), estes parâmetros foram determinados após 30 minutos de incubação com o ácido okadáico. Cada ponto analisado representa a média \pm SD dos três experimentos.

manos com um aumento de 25% no número destas células após 30 minutos de incubação (Fig. 3) e resultando assim um aumento de 20% no conteúdo de proteína quando analisamos a viabilidade celular após 30 minutos (Fig. 4).

DISCUSSÃO

A fosforilação reversível de proteínas catalisadas por proteínas quinases e fosfatases é o mecanismo regulatório mais comum em células Eucarióticas (Zolnierowicz *et al.*, 2000). Como mostrado neste trabalho o ácido okadáico (um inibidor de proteína serina/treonina fosfatase) afetou a viabilidade e a proliferação dos linfócitos humanos, com a resposta variando de acordo com a duração do tratamento.

Apesar do conteúdo de proteína total não indicar seguramente o número de células viáveis, a alteração do seu perfil do conteúdo com o aumento da concentração do ácido okadáico sugerem, juntamente com a diminuição da atividade fosfatásica e da função mitocondrial, um esgotamento metabólico podendo culminar na indução de morte celular.

Este resultado foi semelhante ao obtido por Leira & colaboradores (2001) que observaram alteração morfológica de fibroblastos de pulmão humano após tratamento com este composto, devido a inibição das serina/treonina fosfatases (PP1 e PP2A), pode também ser devido a uma diminuição no potencial de membrana com decréscimo da produção de energia e, conseqüentemente, levando à uma desestabilização celular. Outro resultado importante, foi o demonstrado por Toivola & Eriksson (1999) que justificaram o efeito do OKA em cultura de hepatócitos por alterarem as proteínas do citoesqueleto.

A atividade mitogênica nos linfócitos humanos foi observada apenas na ausência do mitogênico (fitohemaglutinina ou concanavalina), e foi confirmada pelo aumento no

número celular e o conteúdo protéico. Este efeito foi transitório, pois, após 30min não foi mais observado, mostrando uma diminuição gradativa no número total de linfócitos e é explicado pela ativação de quinases, mais especificamente a proteína quinase C por este políeter, que se dá pela interação direta do mesmo com domínios hidrofóbicos desta enzima sendo que o tempo de ação do ácido okadáico é curto, pois sua interação com a PKC deixa-a mais exposta à ação de proteases, promovendo sua inativação. A proteína quinase C ativa media diferentes eventos celulares que culminam na síntese de interleucina 2, a qual é responsável pela proliferação linfocitária. Em outros tipos celulares esta ativação da PKC por políeteres tem um papel importante na carcinogênese (Gopalakrishna & Jaken, 2000).

A atividade fosfatásica no extrato de linfócitos foi insensível ao ácido okadáico, tanto que o efeito mitogênico deste composto provavelmente resultou da ativação da proteína quinase C, a qual tem um papel importante na via de sinalização para proliferação celular, onde a proteína serina/treonina fosfatase PP2B possui um papel crucial na proliferação, mas esta enzima não foi afetada por este forbol ester (Harrison, 1999).

AGRADECIMENTO

Este trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Aoyama, H., Ferreira, C.V., Granjeiro, P.A., Haun, M., Melo, P.S. Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharm. Pharmacol. Commun* 6, 6331-6334, (2000).
- Cortizo, A.M., Bruzzone L., Etcheverry, S.B., Molinuevo. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* 147, 89-99, (2000).
- Daranas, A.H., Fernandez, J.J., Norte, M. Toxic marine microalgae. *Toxicol* 39, 1101-1132, (2001).
- Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* 89, 271-277, (1986).
- Gopalakrishna, R., Jaken, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 1349-1361, (2000).
- Harrison, S., Page, C.P., Spina, D. Airway nerves and protein phosphatase. *Gen. Pharmacol.* 32, 287-298, (1999).
- Hartree, E.F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422-427, (1972).
- Jia, Z. Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem. Ce./ Biol.* 75, 17-26, (1997).
- Leira, F., Botana, L.M., Vieites, J.M., Vieytes, M.R. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol. in Vitro* 15, 199-208, (2001).
- Loveland, B.E., Hertzog, P., Johns, T.G., Mackay, I.R., Vaillant, F., Wang, Z.X. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and anti-proliferative assays. *Biochem. Int.* 27, 501-510, (1992).
- Matias, W.G., Bonini, M., Creppy, E.E., Sanni, A., Traore, A. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. *Human Exp. Toxicol.* 18, 634-639, (1999).
- Maynes, J.T., Bateman, K.S., Cherney, M.M., Das, A.K., Luu, H.A., Holmes, C.F.B., James, M.N.G., (2001). Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 276, 44078-44082.
- Niggli, V., Keller, H., (1997). Low concentrations of the phosphatase inhibitor okadaic acid stop tumor cell locomotion. *Eur. J. Pharmacol.* 324, 99-108.
- O'Shea, J.J., Bailey, T.L., Burns, C., McVicar, D.W., Smyth, M.J. Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10306-10310, (1992).
- Rodriguez, J.A., Haun, M., (1999). Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. *Plant. Med.* 65, 522-526.
- Rossini, G.P., Malaguti, C., Sgarb, N., The toxic response induced by okadaic acid involves processing of multiple caspase isoforms. *Toxicol* 39, 763-770, (2001).
- Wakiya, K., Shibuya, M., (1999). Okadaic acid stimulates the expression of vascular endothelial growth factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 265, 584-588.
- Wang, B., Kishihara, K., Nomoto, K., Sakamoto, T., Zhang, D. Transcriptional regulation of a receptor protein tyrosine phosphatase gene hPTP-j by PKC-mediated signaling pathways in Jurkat and Molt-4 T lymphoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 331-340, (1999).
- Zhang, Z-Y., Zhou, B., Xie, L., (2002). Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol. Therap.* 1, 1-11.
- Zolnierowicz, S., (2000). Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1225-1235.

Endereço para correspondência

Drª Telma Maria Araújo Silva

e-mail: telmaml@yahoo.com.br

Tel: (0xx84)215-4238 - Fax: (0xx84)215-4226

Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS*

Enteroparasites prevalence in ambulatorial patients from Divina Providencia Hospital, Porto Alegre, RS

Roberto Christ Vianna Santos, Jairo Luís Hoerlle, Alzira Resende de Carmo Aquino & Geraldo Attilio De Carli

RESUMO – Realizou-se um estudo para determinar a prevalência de enteroparasitos nos pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência (HDP) de Porto Alegre, RS, entre março e novembro de 2001. A técnica da centrifugo-sedimentação pela formalina-éter foi o procedimento utilizado neste inquérito. Foram estudadas 1776 amostras, das quais 549 (30,9%) estavam infectadas por uma ou mais espécies de enteroparasitos. Em 359 indivíduos (20,2%), foi diagnosticado somente uma espécie de parasito, enquanto que o poliparasitismo representou 10,7% num total de 190 casos. O maior percentual entre os helmintos foi 5,51% (98) para *Ascaris lumbricoides* e, entre os protozoários, *Giardia lamblia*, com 4,0% (71). As associações parasitárias mais frequentes, em infecções por helmintos e protozoários, foram *Entamoeba coli* + *Endolimax nana* com 1,2% (21), *Ascaris lumbricoides* + *Trichuris trichiura* com 1,1% (20) e *Ascaris lumbricoides* + *Giardia lamblia* com 1,1% (20).

PALAVRAS-CHAVE – Helmintos, protozoários, diagnóstico de enteroparasitos, controle de qualidade.

SUMMARY – It was determined the enteroparasites prevalence in outpatients of the Divina Providência Hospital, Porto Alegre, RS. This study revealed that 549 (30.9%) were infected by one or more enteroparasites species and 359 (20.2%) only one while the poliparasitism 10.7% from 190 cases.

KEYWORDS – Helminths, protozoa, enteroparasites diagnostic, quality control.

INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias continuam sendo uma significativa causa de morbidade e mortalidade no mundo, particularmente nos países subdesenvolvidos tropicais e subtropicais. Nos países tropicais em crescimento, onde o nível de higiene, educação e desenvolvimento econômico são muito baixos, o parasitismo, no homem e nos animais, ocorre com grande intensidade e diversidade.

Na zona metropolitana das grandes cidades de países em desenvolvimento, a população estudantil é geralmente mais sadia com hábitos de higiene estabelecidos. Entretanto, entre a modernização e em bairros com edifícios majestosos, existem pequenas áreas onde vivem aglomerados de pessoas marginalizadas das condições mínimas de qualidade de vida. Nessas favelas, compostas por conjuntos de casebres, usualmente com baixas medidas sanitárias, com o meio ambiente poluído, vivem pessoas doentes, especialmente crianças e adultos jovens. Algumas favelas estão situadas nas proximidades dos depósitos de lixo, enquanto outras, perto dos limites do esgoto.

A transmissão dos geohelmintos está diretamente relacionada com as condições de vida e de higiene das comunidades urbanas e rurais. Estes parasitos apresentam uma alta prevalência entre a população de baixo nível socioeconômico, onde os padrões de vida, higiene ambiental, de educação sanitária e de outras

normas básicas para a proteção da saúde são inadequadas e deficientes. Nas zonas rurais, as crianças são as que estão mais expostas as infecções, porque seus hábitos e suas atividades carecem de higiene pessoal.

Na transmissão das infecções por geohelmintos é essencial que o solo esteja contaminado com material fecal. A maior prevalência de parasitos entre as crianças das zonas periféricas não reflete nenhuma predisposição racial, genética ou uma suscetibilidade à infecção, mas uma diferença na educação, na cultura e nos hábitos alimentares, os quais podem afetar a exposição à infecção.

As infecções geohelmínticas podem efetivamente ser controladas, quando o estado socioeconômico de uma região e as condições sanitárias do meio ambiente são implementadas e assim implantadas outras medidas, tais como a educação para a saúde e a avaliação do estado nutricional da população.

O objetivo desse estudo foi estabelecer a prevalência de enteroparasitos nos pacientes de ambulatório do Hospital Divina Providência (HDP), Porto Alegre, RS.

MATERIAIS E MÉTODOS

População estudada

Esse estudo foi realizado em uma população de 1.776 pessoas, crianças e adultos, pacientes dos ambulatórios do Hospital Divina Providência (HDP), durante o período de março a novembro de 2001.

Recebido em 16/12/2003
Aprovado em 16/3/2004

*Trabalho desenvolvido no Laboratório Unidos de Pesquisas Clínicas – Unilab, Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da PUCRS, Porto Alegre, RS e Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Franciscano – UNIFRA.

Exame coproparasitológico

O procedimento utilizado para o exame parasitológico das fezes foi a técnica da centrifugo-sedimentação pela formalina-éter (Ritchie, 1948)^{4,5}. Foi examinada uma amostra de cada pessoa dentro de um período de 12 horas após a colheita. Devido às dificuldades impostas pelos pacientes, não foi possível realizar o método da fita de celofane adesiva e transparente para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis* em toda a população estudada.

Controle de Qualidade

Foi verificada semanalmente a formalina e a solução fisiológica, a fim de visualizar alguma contaminação visível. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga foi calibrada, amostras fecais sabidamente positivas foram concentradas e os organismos identificados. O micrômetro ocular e o microscópio foram calibrados a cada 12 meses. Os resultados do controle de qualidade foram sempre registrados.

RESULTADOS

Durante o período de março a novembro de 2001 foi realizado um estudo coproparasitológico nos pacientes do HDP. Pelos dados observados, das 1.776 amostras examinadas, 30,9% (549) apresentaram resultados positivos, e 69,1% (1.227) resultados negativos para enteroparasitos, dos quais 20,2% (359) estavam infectados por um único parasito e 10,7% (190) por mais de um organismo (Tab. I).

A Tab. II expressa a distribuição específica dos parasitos na população examinada, sendo que o maior

TABELA I
Prevalência de enteroparasitos em 1776 pacientes ambulatoriais do HDP, 2001

Nº de amostras examinadas	Amostras negativas	Amostras positivas		
		Monoparasitismo	Poliparasitismo	Total
1776	1227	359	190	549
100%	69,1%	20,2%	10,7%	30,9%

TABELA II
Distribuição de enteroparasitos, HDP, 2001

Monoparasitismo			
Parasitos	Frequência	%	
Helmintos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	98	5,5
	<i>Trichuris trichiura</i>	29	1,6
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	7	0,4
	<i>Hymenolepis nana</i>	5	0,3
	<i>Taenia sp.</i>	1	0,1
Protozoários	<i>Giardia lamblia</i>	71	4,0
	<i>Endolimax nana</i>	61	3,4
	<i>Entamoeba coli</i>	53	3,0
	<i>E. histolytica/E. dispar*</i>	29	1,6
	<i>Blastoscistis hominis</i>	3	0,2
	<i>Iodameba butschilii</i>	2	0,1

* *Entamoeba histolytica* é usada para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto que a *E. dispar* é agora usada para designar a existência de zimodemos não patogênicos¹⁸. Entretanto, apesar dos trofozoítos (*E. histolytica*) conterem hemácias ingeridas, os dois organismos só podem ser diferenciados tomando como base a morfologia no estudo de esfregaços fecais permanentemente corados.

percentual geral obtido para os helmintos foi de 5,5% (98) para o *Ascaris lumbricoides* e, entre os protozoários, a *Giardia lamblia*, com 4,0% (71).

A Tab. III demonstra as associações de parasitos mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e/ou protozoários, e permitiu verificar que as combinações mais comuns foram *A. lumbricoides* + *Trichuris trichiura* com 1,1% (20), *A. lumbricoides* + *G. lamblia* com 1,1% (20) e *Entamoeba coli* + *Endolimax nana* com 1,2% (21).

A Fig. 1 mostra os helmintos e protozoários, demonstrando que 134 (7,5%) pacientes estavam infectados por alguma espécie de nematóide e que 6 (0,3%) pacientes estavam infectados por alguma espécie de cestóide, enquanto que 148 (8,3%) pacientes estavam infectados por diferentes espécies de amebas e 71 (4,0%) por outras espécies de flagelados.

TABELA III
Associações de parasitos mais frequentes em infecções por helmintos e protozoários

Associações		Freq.	%
Helmintos + Helmintos	<i>T. trichiura</i> + <i>A. lumbricoides</i>	20	1,1
	<i>H. nana</i> + <i>A. lumbricoides</i>	2	0,1
	<i>S. stercoralis</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1	0,1
Helmintos + Protozoários	<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>G. lamblia</i>	16	0,9
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. nana</i>	10	0,6
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>G. lamblia</i>	20	1,1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. coli</i>	19	1,1
	<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>E. histolytica/E. dispar*</i>	8	0,5
Protozoários + Protozoários	Outras combinações	43	2,4
	<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i>	21	1,2
	<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica/E. dispar*</i>	9	0,5
	<i>E. histolytica</i> + <i>E. nana</i>	9	0,5
	<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i>	2	0,1
	<i>E. nana</i> + <i>G. lamblia</i>	2	0,1
	<i>E. histolytica/E. dispar*</i> + <i>E. nana</i> + <i>E. coli</i>	2	0,1
	Outras Combinações	6	0,3
Total	190	10,7	

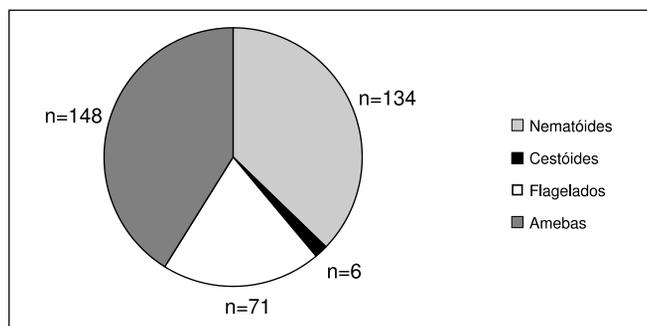


FIG. 1 - Helmintos e protozoários diagnosticados, HDP, 2001. (n=número de amostras).

DISCUSSÃO

As infecções por enteroparasitos podem, efetivamente, ser controladas quando o estado socioeconômico de uma região, as condições sanitárias, educação para a saúde e avaliação do estado nutricional da população são implantados^{2,5,7,8}. A educação sanitária visa a promoção dos hábitos de higiene, favorecer uma nutrição adequada e criar um ambiente propício para o bem estar físico e mental⁹. As consequências de infecções intestinais, como o risco de doenças invasivas e obstrutivas, deve ser sempre consideradas.

A realização periódica de inquéritos coprológicos se faz necessário para o controle das enteroparasitoses e medidas de saúde devem ser realizadas para o controle do parasitismo.

A prevalência da infecção com protozoários e helmintos intestinais foi baixa entre os pacientes do ambulatório do HDP, provavelmente, devido aos fatores socioeconômicos e às medidas sanitárias¹⁰. Apesar destes índices, permanece a necessidade de levar a esta população, noções de higiene e educação sanitária^{1,3,7,9,10}.

Os percentuais de positividade de enteroparasitos, encontrados neste inquérito, não são coincidentes com os resultados obtidos por diferentes estudos realizados no Estado do Rio Grande do Sul^{1,3,6,7,9,10,15,17}, devido a colheita da amostra, métodos e técnicas utilizadas e profissionais com capacitação diversa. Esses fatores somados podem dificultar uma avaliação comparativa dos diferentes estudos realizados no RS, visto que a literatura não descreve estudos realizados em pacientes de ambulatórios de hospitais. Entretanto, ficou mais uma vez demonstrado, que as parasitoses intestinais continuam sendo as doenças mais comuns entre as populações urbanas e rurais.

Pesquisas realizadas anteriormente por De Carli *et al.* (1989, 1992)^{15,1}, em 36 vilas marginais da área Metropolitana de Porto Alegre mostraram taxas de positividade iguais a 68,9% (11.341/16.460). Em trabalhadores rurais assentados em Charqueadas, Capela de Santana e Fazenda de São Pedro, no ano de 1994, o índice de infecção foi de 42,4% (39/92), 51,0% (76/149) e 56,3% (36/64), respectivamente⁹. Em um outro estudo realizado por De Carli *et al.* (1997)¹⁷, os índices de positividade foram de 30,6% (363/1186), em uma população urbana e rural da região carbonífera de Arroio dos Ratos.

O nível de performance de qualquer diagnóstico em Parasitologia Clínica é um reflexo direto do treinamento e da qualificação do pessoal técnico, dos recursos do laboratório e dos esforços positivos na busca da melhoria do desempenho técnico¹⁴.

Urge a necessidade para a avaliação correta dos dados, a verificação dos procedimentos utilizados e a obrigatoriedade da implantação permanente do controle de qualidade.

As parasitoses intestinais constituem um dos problemas mais relevantes de saúde pública, especialmente nos países tropicais e subtropicais. São muito mais prevalentes em famílias urbanas e rurais de baixa renda, nas quais as deficiências nutricionais são também mais frequentes. Assim, nessa numerosa população, às repercussões das enteroparasitoses somam-se os efeitos das carências socio-econômicas e ambientais. As cri-

anças mais vulneráveis sofrem não só os efeitos sobre o seu estado nutricional como também as repercussões sobre o seu estado imunológico. Apesar do grande avanço tecnológico da Medicina no século XX as enteroparasitoses ainda são causa elevada de morbidade na população.

REFERÊNCIAS

1. De Carli G, Candia E. Prevalência de geohelmintos entre escolares residentes nas vilas periféricas de Porto Alegre, RS. *Revista Bras. Farm.* 1992; 73: 7-8.
2. Ludwig K.M., Frei F., Paes J.T.R. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32: 547-555.
3. Santos R.C.V., Valente M.P., Rosset I., Andreazza M., Tasca T., De Carli G. Prevalência de enteroparasitoses entre estudantes de escola estadual de primeiro grau situada no campo da Tuca, Porto Alegre, RS. In: Resumos do IX Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos e VII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos. Florianópolis-SC. Pág. 65. 2000.
4. Ritchie L.S. Na ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept*, 8: 326, 1948.
5. Ritchie L.S., Lin S., Moon A.P. *et al.* The possible effects of ph and specific gravity on the ether - sedimentation procedure in concentration eggs and cysts. *Am J Trop Med Hyg*, 9: 444-449, 1960.
6. De Carli G. Controle das parasitoses intestinais através da extensão comunitária. *Acta Biológica Leopoldensia*. 1995; 17: 7-11.
7. De Carli G., Candia E., Saraiva O. Epidemiologia da Giardia lamblia nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre. *Revista Bras. Farm.* 1990; 71: 94-96.
8. Giraldo N., Vidotto O., Navarro I.T., Garcia J.L. Enteroparasites prevalence among day care and elementary school children of municipal schools, Rolândia, PR, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34: 385-387.
9. De Carli G.A., Spalding S.M., Rott M., Ribeiro L., Chaves A., Da Silva A.C., Wendorff A., Matos S. & Pozza C. Incidência de enteroparasitas entre colonos sem terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no Estado do Rio Grande do Sul. *RBAC*, 26: 123-125, 1994.
10. De Carli G., Tasca T. Incidência de enteroparasitos na cidade mais fria do Brasil: São José dos Ausentes, RS. *RBAC*, 33: 19-20, 2001.
11. Gross R., Schell B., Molina M.C.B., Leão M.A.C., Strack U. The impact of improvement of water supply and sanitation facilities on diarrhea and intestinal parasites: a brazilian experience with children in two low-income urban communities. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 23: 214-220, 1989.
12. Ferreira C.B., Junior O.M. Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinesia, Uberlândia, MG: Um estudo piloto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30: 373-377, 1997.
13. Prado M.S., Barreto M.L., Strina A., Faria J.A.S., Nobre A.A., Jesus S.R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador, BA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 99-101, 2001.
14. De Carli G.A., Oliveira O.L.M.. Controle de qualidade em parasitologia clínica - Diagnóstico microscópico dos parasitos. *RBAC* 31: 159-174, 1999.
15. De Carli G.A., Candia E., Nunes E., Silva A., Martin R., Antunes I., Farias G., Leiria B. & Candela M.H. Extensão comunitária - Estudo de enteroparasitoses e das condições sócio-econômicas das vilas periféricas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1965 a 1981. *Cad. Farm.* 5: 73-92, 1989.
16. Miranda, R.A., Xavier F.B., Nascimento J.R.L., Menezes R.C. Prevalência de parasitismo intestinal nas aldeias indígenas da tribo Tembê, Amazônia Oriental Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 389-393, 1999.
17. De Carli G.A., Mentz M., Rott M.B., Silva A.C.A., Wendorff A., Tasca T., Castilhos D.S., De Carli G., Montenegro R.A., Mylius L.. Prevalência das enteroparasitoses na população urbana e rural da região carbonífera da cidade de Arroio dos Ratos, no Estado do Rio Grande do Sul. *Ver. Bras. Farm.* 78: 83-85, 1997.
18. De Carli, G.A. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. Editora Atheneu, São Paulo, 2001.

Endereço para correspondência

Prof. Roberto Christ Vianna Santos/roberto@unifra.br
Lab. de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Franciscano - UNIFRA
Rua dos Andradas, 1614 - Cep 97010-032 - Centro - Santa Maria-RS
Fone: (0xx55) 220-1200