

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

A RBAC é classificada como Qualis Internacional A em farmácia.



Consolidando o Futuro das
Análises Clínicas no Brasil

3

VOLUME 40
2008

SUMÁRIO

Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril <i>Paulo Murillo Neufeld & Pedrina Cunha de Oliveira</i> Preservation of dermatophyte fungi by sterile distilled water technique	167
Prevalência da anemia e deficiências nutricionais, através de diferentes parâmetros laboratoriais, em mulheres grávidas atendidas em dois serviços de saúde pública no Rio Grande do Sul..... <i>Caroline Dani, Simone Rossetto, Simone M. Castro, Sandrine C. Wagner</i> Anemia prevalence and nutritional deficiencies, through different laboratory parameters, in pregnant women assisted in two services of public health in Rio Grande do Sul	171
Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial - Revisão..... <i>Eduardo Caetano Brandão F. da Silva; Maria Almerice Lopes da Silva & Paula Alexandra dos S. Oliveira</i> Lymphatic Filariasis: Progresses and Perspectives of the Laboratorial Diagnostic - A Review	177
Prevalência de risco cardiovascular em pacientes que fazem uso de terapia anti-retroviral..... <i>Aurea Regina Telles Pupulin, Dirceu Cassarotti, Larissa Mosko, Mirian Hitomi Ando, Miguel Spack Junior, Sandra Vieira, Ciomar Aparecida Bersani Amado</i> Prevalence of cardiovascular risk in patients who make use of antiretroviral therapy	183
Vacina de DNA contra doenças infecciosas..... <i>Juliana Costa Curta, Rita de Cássia Garcia Simão, Juliana Seger</i> DNA vaccines against infectious diseases	187
Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia..... <i>Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD; Adriana Parisotto Macedo, Ms; Anna Paula Batschauer, Ms; Maria das Graças Carvalho, PhD</i> Platelet - Rich Plasma and its application in dentistry	193
A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura..... <i>Valéria Bernadete Leite Quixabeira, Vera Aparecida Saddi</i> The importance of immunophenotyping and cytogenetics in the diagnosis of leukemia: a literature review	199
Determinação do sexo do feto através de uma nova técnica não invasiva baseada em PCR..... <i>Malta, FSV; Torres, PORB; Ferreira, ACS & Pardini, VC</i> Determination of fetal sex by a new PCR method non invasive	203
Isolamento de <i>Candida spp.</i> da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico..... <i>Débora Avrella & Leticia Silveira Goulart</i> Isolation of <i>Candida spp.</i> of the oral mucus of patients submitted to the chemotherapeutic treatment	205
Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres profissionais do sexo, Umuarama, Estado do Paraná..... <i>Netton Anderson Baspalez Correa; Francisco H. Matumoto; Maria Valdrinez Campana Lonardoni</i> Sexually transmitted diseases in female sex workers in Umuarama, Paraná State	209
Câncer do colo do útero: influência da adequação da amostra cervical no resultado do exame citopatológico..... <i>Nair Pereira Dean Ramos, Joaquina de Araújo Amorim, Carlos Eduardo de Queiroz Lima</i> Uterus cancer: influence of the suitability of the cervical sample on the result citopatologic test	215
Prevalência de anemia nas gestantes atendidas em Unidades de Saúde em Feira de Santana, Bahia, entre outubro de 2005 e março de 2006..... <i>Pedro Nascimento Prates Santos & Eneida de Moraes Marcilio Cerqueira</i> Prevalence of anemia in pregnant women attended by the Health Care Units in the municipality of Feira de Santana within the period between October 2005 and March 2006	219
Frequência de hipotireoidismo em pacientes com distúrbio bipolar tratados com carbonato de lítio..... <i>Salimara Rampelotto Botton; Sandra Trevisan Beck; Bruno Rampelotto Botton; Martha Noal e Andreza Fabro de Bem</i> Frequency of hypothyroidism in patients with bipolar disorder treated with lithium	225
Validação do método de detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real..... <i>Lilian de Assis Poiares, Fabiano Sandrini, Paulo de Sá Osório, Alvaro Largura e Rita de Cássia Garcia Simão</i> Validation of a Chlamydia trachomatis detection method by Real Time Polymerase Chain Reaction	229
Perfil dos casos de meningite bacteriana e viral na região do Alto Uruguai, RS..... <i>Darieli Alves Moreira, Carla Caprini Totti, Viviane Câmara dos Reis, Vanusa Manfredini, Luciane C. Mylius</i> The profile of the cases of bacterial and viral meningitis at Alto Uruguay region, RS	233
Importância da identificação das mutações do proto-oncogene RET e sua atuação no desenvolvimento dos diversos fenótipos das neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2..... <i>Vanessa Cristina de Oliveira, Willian Pedrosa de Lima, Frederico Scott Varela Malta, Victor Cavalcanti Pardini, Alessandro Clayton de Souza Ferreira</i> Importance of RET proto-oncogene mutations identification and its performance in the development of the multiples endocrines neoplasias type 2 several phenotypes	237

Prezados colegas,

***E**sta edição da RBAC tem para todos nós que compomos a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas um significado bem especial. Ela marca o 40º aniversário de fundação da SBAC.*

A RBAC tem um significado bem especial exatamente por priorizarmos o lado científico e, embora o mercado queira nos transformar, essa nossa essência não vai mudar nunca.

Somos uma sociedade científica por natureza filosófica e nos últimos 40 anos temos nos dedicado integralmente para que essa nossa vontade, de fazer e levar ciência a todos os rincões deste nosso imenso Brasil, não seja em vão e nem desapareça.

Nossa preocupação sempre é possibilitar que o menor laboratório existente no nosso país seja tão bom tecnicamente quanto o maior.

E, neste sentido, a RBAC cumpre um papel relevante.

É ela quem acaba por ser a grande companheira de estudantes da graduação, de mestres e doutores na hora de se atualizar em muitos lugares pelo Brasil e quando um de nós, assessores da SBAC, vamos às universidades e vemos a RBAC nas bibliotecas, sobre as mesas, sentimos, sim, uma grande satisfação: a de que estamos realizando um grandioso e nobre trabalho em prol da saúde de nosso país.

E esta edição também tem outro caráter comemorativo. A Revista Brasileira de Análises Clínicas, RBAC, foi classificada pela comissão de avaliação do Programa Qualis, da Capes, na categoria Internacional A, como periódico com fator de impacto igual ou superior a mediana da área de farmácia, tendo como referência base para a classificação dos periódicos de circulação internacional o JCR (Journal Citation Reports).

A RBAC, também, mantém a classificação Qualis Nacional B em Medicina I , Medicina II , Multidisciplinar e Saúde Coletiva, por estar indexada no LILACS e ser editada por sociedades científicas nacionais representativas da área, no caso a SBAC.

Isto significa que os artigos publicados nesta Revista são válidos como requisitos de publicação dos programas de Mestrado e Doutorado, dentro e fora do país.

Por último, estamos a 11 meses do maior congresso mundial da área laboratorial, o 20º Worldlab IFCC 2008 que será realizado em Fortaleza (CE), no período de 28/09 a 02/10/2008. Estamos trabalhando arduamente. Em paralelo com ele, estaremos realizando o 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e o 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica. Todos cuidados com muito zelo e carinho.

E para que você, assinante e leitor da RBAC, tenha já uma noção do que teremos pela frente, estamos publicando nas ultimas páginas deste exemplar a grade científica preliminar do evento. Vale a pena conferir.

Por tudo isso, deleite-se e aproveite a “nossa” revista científica.

Um abraço,

Ulisses Tuma,
Presidente da SBAC

Diretor Responsável

Prof. Mateus Mandu de Souza

Vice-Diretor

Prof. João Ciribelli Guimarães

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

Assinatura Anual: R\$ 105,00
Exterior US\$ 50.

Indexada no LILACS – www.bireme.br
<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislnd.exe/iah/online>
Portão periódicos – www.periodicos.capes.gov.br
Classificação CAPES: Internacional A - Farmácia,
Nacional B - Medicina I e II, Multidisciplinar e
Saúde Coletiva.
Farmácia, Medicina, Odontologia
www.capes.gov.br - <http://qualis.capes.gov.br/webqualis/ConsultaPeriodicos.faces>

Tiragem: 4.900 exemplares

Bioquímica – Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Marcelo Quintão Mendes (MG), Dr. Geraldo Pichet (PR), Dra. Marileia Scartezini (PR), Dr. Arício Treitinger (SC), Dr. Paulo Mocarelli (ITA), Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla (SP), Dr. Ary Henrique Filho (Urinálise) (GO), Dr. Daniel Mazziota (AR), Dr. Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Dra. Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Dra. Marize Oliveira Sousa (MG), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Citologia – Dr. Ely Chaves (PB), Dra. Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Carlos Eduardo Queiroz Lima (PE), Dra. Rita Gorete Amaral (GO), Dr. Alexandre Onofre (SE), Dra. Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade – Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luís Fernando Barcelos (RS)

Endocrinologia – Dr. Carlos Alberto Camargo (SP), Dra. Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia – Dra. Regina Helena Queiroz (SP), Dra. Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia – Dr. Antônio Márcio Lopes (MG), Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Amauri Simonetti (RS), Dra. Cassia Maria Zoccoli (SC), Dra. Carmen Paz Oplustil (SP)

Imunologia – Dr. Paulo Jaconi Saraiva (RS), Dr. Antônio Walter Ferreira (SP), Dra. Adelaide José Vaz (SP)

Parasitologia – Dr. Antônio Pedro Soares (MG), Dr. Paulo S. Minami (SP), Dr. Geraldo Atilio De Carli (RS), Dr. Jerolimo Lopes Aquino (MT)

Micologia – Dr. Paulo Murilo Neufeld (RJ), Dra. Maria José Gianini (SP), Dra. Regina Célia Candido (SP)

Biologia Molecular – Dr. Mario Hiroyuki Hirata (SP), Dr. Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Dr. Marcelo Mascarenhas (RS), Dra. Kelly Melo (SP)

Hematologia – Dr. Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dr. Celso Spada (SC), Dr. Paulo César Naoum (SP), Dr. Julio Cezar Merlin (PR), Dr. Paulo Henrique da Silva (PR)



SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS®

FILIAÇÃO

IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE
COLABIOCLI - CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS
CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE
AMN - ASOCIACIÓN MERCOSUR DE NORMALIZACIÓN
ONA - ORGANIZACIÓN NACIONAL DE ACREDITACIÓN

Rua Vicente Licínio, 99 • Tel.: (0XX21) 2187-0800 • Fax: (0XX21) 2187-0805
Rio de Janeiro • RJ • 20270-902
Home page: www.sbac.org.br • e-mail: geral@sbac.org.br

Diretoria

Presidente

Dr. Ulisses Tuma (GO)

Vice-Presidente

Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

Secretária Geral

Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

Secretário

Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)

Tesoureiro

Dr. Estevão José Colnago (RJ)

Tesoureiro Adjunto

Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

MEMBROS DO CONSELHO FISCAL

Titulares: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dra. Geruza Maria Caldas Maia (RN),

Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE)

Suplente: Dr. Homero Jackson de Jesus Lopes (MG), Dr. José Ronaldo Cardoso (MG) e
Dr. Marcelo Pilonetto (PR)

COMISSÃO DE NORMAS E HABILITAÇÃO

Coordenação: Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

Membros: Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Prof. Durval Mazzei Nogueira (SP), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

DIRETOR DE CURSOS

Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

REPRESENTANTES:

IFCC: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Ulisses Tuma (GO)

COLABIOCLI: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ)

AMN - Asociación Mercosur de Normalización:

Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS) e Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ)

ONA – Organização Nacional de Acreditação:

Dr. José Abol Corrêa (RJ)

Governamental: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE

Coordenação: Dr. José Abol Corrêa (RJ)

Assessores: Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dra. Maria Isabel Figueiras Neufeld (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Paulo Murilo Neufeld (RJ), Dra. Thais Lisboa Machado (RJ)

COMISSÃO DE CONGRESSOS

Membros: Dr. Álvaro largura (PR), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE), Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. Elias José Cury Júnior (GO), Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa (GO)

INFORMATIVO DA SBAC

Membros: Dr. Antônio Jaguaribe Neto (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

CONSELHO DELIBERATIVO

Membros Natos: Prof. Ediláudio Luna de Carvalho (PB), Dr. Evanyr Seabra Nogueira (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Ney Haushahn (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Humberto Marques Tiburcio (MG)

REGIONAIS DA SOCIEDADE

Bahia: Presidente: Dr. Mário Martinelli Júnior - Vice-Presidente: Dr. Petrólio Primo Coêlho - Secretário: Dr. Anderson Lobo Alvim - Tesoureiro: Dr. Luiz Roberto de Carvalho;

Ceará: Presidente: Dr. Francisco Einstein do Nascimento - Vice-Presidente: Dr. José Antonio Perez Silveira - Secretária: Dra. Maria Guilhermina Jaborandy Rodrigues - Tesoureiro: Dra. Zirlane Castelo Branco Coelho - Tesoureira Adjunta: Dra. Maria Iracema de Aguiar Patrício;

Distrito Federal: Presidente: Dr. Antônio Alves de Sousa - Vice-Presidente: Dr. Paulo Roberto Sabino Júnior - Secretário: Dr. José Persival Rico - Tesoureiro: Dr. Hélio José de Araújo;

Goias: Presidente: Dr. Elias José Cury Júnior - Vice-Presidente: Dr. Ulisses Tuma - Secretária:

Dra. Cristina Lobo Batista de A. Bastos - Tesoureira: Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa;

Minas Gerais: Presidente: Dr. José Ronaldo Cardoso - Vice-Presidente: Dr. José Alair Couto - Secretário: Dr. Vicente Odail de Souza Espindola - Tesoureiro: Dr. Glauco de Paulo B. Silveira;

Paraná: Presidente: Dr. Marcelo Pilonetto - Vice-Presidente: Dr. Paulo Hatschbach - Secretário: Dr. Samuel Ricardo Comar - Tesoureiro: Dr. Luciano André Perini;

Pernambuco: Presidente: Dr. Jurandi David da Silva - Vice-Presidente: Dr. João Gonçalves Júnior - Secretária: Dra. Maria Amélia Vieira Maciel - Tesoureiro: Dr. José Araújo de Carvalho;

Rio Grande do Norte: Presidente: Dra. Geruza Maria Caldas Maia - Vice-Presidente: Dra. Lenira da Silva Costa - Secretária Geral: Dra. Andréa Luciana Araújo da C. Fernandes - Secretária: Maria da Conceição Silva Fernandes - Tesoureiro: Waldenilson Dutra Germano da Silva - Tesoureira Adjunta: Dra. Dóris Cavalcante Huguenin;

Rio Grande do Sul: Presidente: Dra. Alzira Resende do Carmo Aquino - Vice-Presidente: Dr. Marcello Ávila Mascarenhas - Secretária: Maria Cristina Bispo Freitas - Tesoureira: Dra. Carmen Pilla;

DELEGADOS DA SOCIEDADE

Alagoas: Dr. José Pereira Mendes Júnior; **Amazonas:** Dr. João Avelino Neto; **Espírito Santo:** Dr. Henrique Tommasi Netto; **Maranhão:** Dra. Rita Maria do A. B. Palhano; **Mato Grosso:** Dr. Jerolimo Lopes Aquino; **Mato Grosso do Sul:** Dra. Lenilde Brandão Arão; **Pará:** Dr. Sérgio Luiz Vasconcelos do Vale; **Paraíba:** Dra. Tereza Cristina Davi Marques; **Piauí:** Dr. Gloubert Nobrega dos Santos; **Rondônia/Acre:** Dra. Alba Lucia Cordeiro Alves; **Santa Catarina:** Dr. Caio Roberto Salvino; **São Paulo:** Dr. Marcos Machado Ferreira; **Sergipe:** Dra. Maria da Conceição L. Oliveira; **Tocantins:** Dr. Francisco Wellington Macedo.

Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril

Preservation of dermatophyte fungi by sterile distilled water technique

Paulo Murillo Neufeld¹ & Pedrina Cunha de Oliveira²

RESUMO - Quinze cepas de dermatófitos estocadas pela técnica da água destilada estéril, por 11 anos, na Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, foram avaliadas quanto à viabilidade e estabilidade dos aspectos morfológicos característicos. Do total de cepas, 14 (93.3%) mantiveram-se viáveis e alterações pleomórficas não foram detectadas. A técnica da água destilada se mostrou efetiva na preservação de cepas de dermatófitos por longos períodos de tempo.

PALAVRAS-CHAVE - Dermatófitos, preservação, viabilidade, água destilada estéril.

SUMMARY - Fifteen dermatophyte strains preserved by sterile distilled water technique during 11 years in the Fungus Culture Collection of the Oswaldo Cruz Institute were evaluated in terms of viability and stability of morphological aspects. Of the total number of strains, 14 (93.3%) were viable and no pleomorphic alterations were detected. The distilled water technique showed effective for long-term laboratory storage of dermatophyte strains.

KEYWORDS - Dermatophytes, preservation, viability, sterile distilled water.

—INTRODUÇÃO

O principal objetivo da preservação de cepas fúngicas é a manutenção das características biológicas dos isolados (Heckley, 1978). A conservação dos aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e metabólicos dessas cepas é frequentemente requerida para estudos de taxonomia, perfil bioquímico, diagnóstico laboratorial e produção de substâncias de interesse comercial e industrial (Baker & Jeffries, 2006). Para obter este estado, livre de variações morfo-fisiológicas, por longos períodos de tempo, a suspensão do metabolismo celular é condição fundamental (Grivell e Jackson, 1969). Os métodos comumente empregados para a preservação de microrganismos incluem: óleo mineral (Neufeld & Sarquis, 1999), água destilada (Deshmukh, 2003), salina com óleo mineral (Brilhante *et al.* 2004), sílica gel (Gentle & Scott, 1979), solo (Bakerspiegel, 1953), liofilização (Rybníkar, 1995), congelamento a -70° C (Passarell & McGinnis, 1992) e nitrogênio líquido (Stalpers *et al.*, 1987); porém, alguns são laboriosos e apresentam custos elevados de implantação, o que os tornam inacessíveis aos laboratórios de pequeno e médio porte (Borman *et al.*, 2006). Inicialmente descrita por Castellani (1939), a técnica da água destilada estéril é, contudo, simples, econômica e capaz de assegurar a viabilidade, estabilidade, pureza e patogenicidade de um grande número de organismos fúngicos (Castellani, 1967).

Um grupo de fungos particularmente sensível à preservação em laboratório são os dermatófitos (Baker & Jeffries, 2006). O termo dermatófito corresponde a uma designação sob a qual estão agrupados fungos muito proximamente relacionados dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* que têm a habilidade de invadir e colonizar os tecidos queratinizados (pele, pêlo e unhas) do hospedeiro humano e animal (Weitzman & Summerbell, 1995). Esses patógenos, quando estocados por longo tempo, apresentam alterações pleomórficas que levam a mudanças irreversíveis em seus atributos morfológicos e propriedades fisiológicas (Weitzman, 1964). O pleomorfismo em dermatófitos pode ser definido como sendo uma instabilidade das características culturais associadas à formação progressiva de hifas atípicas que surgem como um micélio esbranquiçado na colônia, apresentando perda parcial ou total da

capacidade de esporulação (Bistis, 1959). Com bons resultados, a água destilada estéril tem sido empregada na prevenção dessas alterações (Ellis, 1979).

O presente trabalho documenta o estudo sobre a preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril, em uma Coleção de Cultura de Fungos, por um prolongado período de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

Um número de 15 cepas de dermatófitos isoladas de meio ambiente e de lesões humana e animal e preservadas por 11 anos, em água destilada estéril, na Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, foram incluídas neste estudo. Como cada uma dessas cepas foi preservada com diferentes datas de subcultivos, 42 amostras foram avaliadas no total.

A preservação em água destilada foi procedida de acordo com Castellani (1939). Resumidamente, culturas jovens e esporulantes em agar de Sabouraud dextrosado - SDA [30 g l⁻¹ glucose (Difco, Detroit, MI, USA); 10g l⁻¹ bactopectone (Difco, MI, USA); 20g l⁻¹ agar (Merck, Darmstadt, Germany)] foram replicadas para agar batata dextrosado - BDA (Difco, Detroit, MI, USA) contidos em placas de Petri. Após análise micromorfológica das cepas, blocos de meio de cultura de 1 cm² apresentando crescimento fúngico foram retirados das placas de Petri e transferidos para frascos do tipo penicilina com 10 ml de água destilada estéril. Consecutivamente, esses frascos foram fechados com rolhas de borracha e selados com lacres de alumínio e estocados à temperatura ambiente.

Para a avaliação das viabilidades, as 15 cepas preservadas em água destilada estéril foram subcultivadas para SDA e incubadas à temperatura ambiente por até um mês. Após este período, as cepas que não apresentaram crescimento foram consideradas não-viáveis.

A identificação das cepas de dermatófitos viáveis em água destilada foi confirmada a partir de cultivos em lâmina (Riddel, 1950). A técnica do cultivo em lâmina consiste em se inocular um fragmento de cultura fúngica em pequenos blocos de SDA de 1 cm² depositados sobre uma lâmina de microscopia que, em seguida à inoculação, são cobertos

Recebido em
Aprovado em

¹Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, e-mail: pmneufeld@phama.ufrj.br

²Departamento de Micologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

com uma lamínula. Após o período de incubação, a lamínula que contém o crescimento é então corada com lactofenol com azul de algodão e submetida à inspeção microscópica. A descrição das cepas seguiu os modelos propostos por Kane *et al.* (1997) e Rebell & Taplin (1979).

RESULTADOS

Quatorze (93.3%), das 15 cepas de dermatófitos analisadas foram recuperadas da água destilada depois de um período de preservação de 11 anos. As cepas que apresentaram viabilidade em água destilada são mostradas na tabela 1. Apenas a cepa IOC- 3720 não apresentou viabilidade. Todas as cepas viáveis aqui investigadas não mostraram alterações de seus aspectos micromorfológicos característicos (figs. 1-3).

TABELA I

Viabilidade de cepas de dermatófitos preservadas em água destilada por diferentes períodos de tempo.

Cepas	No.	Data de Entrada	Data dos Subcultivos		
<i>Epidermophyton floccosum</i>	3705	1983	1991 (+)	1985 (+)	1983 (+)
<i>Microsporum canis</i>	3706	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>M. canis</i>	3707	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>M. canis</i>	3737	d	1991 (+)	1985 (+)	1984 (+)
<i>Microsporum gypseum</i>	3708	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>M. gypseum</i>	3710	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>M. gypseum</i>	3738	d	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>Microsporum nanum</i>	3721	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>Trichophyton erinacei</i>	3719	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	3720	1983	1983 (-)		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3739	d	1991 (+)	1985 (+)	1984 (+)
<i>Trichophyton quinckeanum</i>	3723	1983	1985 (+)	1984 (+)	1983 (+)
<i>Trichophyton rubrum</i>	3725	1983	1983 (+)	d (+)	
<i>T. rubrum</i>	3726	1983	1985 (+)	1983 (+)	
<i>T. rubrum</i>	3727	1983	1985 (+)	1983 (+)	

Legenda: d, data desconhecida ; -, ausência de crescimento; +, presença de crescimento; (+), viabilidade.

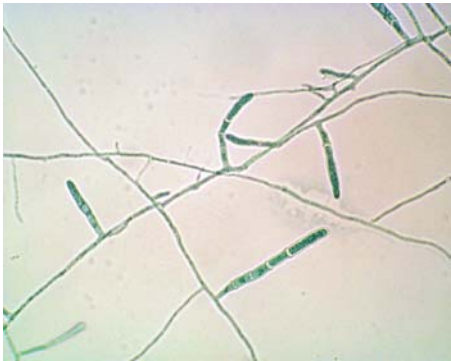


Figura1. Micromorfologia do Gênero *Epidermophyton*: Hifas septadas hialinas, macroconídios multisseptados em forma de clava (microconídios ausentes).



Figura2. Micromorfologia do Gênero *Microsporum*: Hifas septadas hialinas e macroconídios multisseptados fusiformes.

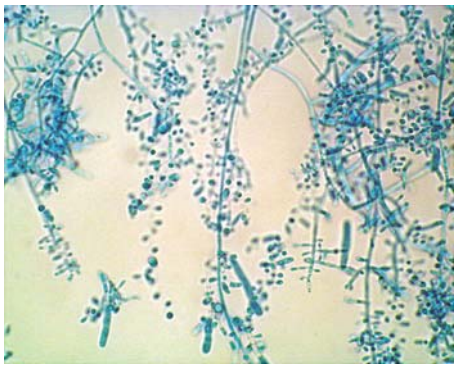


Figura2. Micromorfologia do Gênero *Trichophyton*: Hifas septadas hialinas, macroconídios multisseptados claviformes e microconídios unicelulares piriformes.

DISCUSSÃO

As cepas de dermatófitos avaliadas neste trabalho apresentaram uma elevada taxa de recuperação em água destilada. Altos percentuais de sobrevivência fúngica, empregando esta técnica, também foram relatados por McGinnis *et al.* (1974) e Komaid (1988). A viabilidade da maioria dos fungos em água destilada pode ser explicada, até certo ponto, pelas reservas nutricionais carregadas com as células que compõem o primeiro inóculo (Castellani, 1963). Segundo Qiangqiang *et al.* (1998), a prevenção da evaporação, o uso de culturas em estado ativo de esporulação e o controle da contaminação condicionam, fortemente, o sucesso da técnica. A qualidade da água utilizada na preservação de fungos é outro fator condicionante para a recuperação desses microrganismos, já que, eventualmente, pode conter traços de elementos com efeitos tóxicos que inviabilizam a cultura. Além disso, os frascos empregados na estocagem das cepas podem apresentar contaminação por ions e outras substâncias que, quando liberados na suspensão, podem também vir a exercer uma atividade inibidora da fisiologia celular (Odds, 1991). Está bem estabelecido que culturas de dermatófitos submetidas à prolongada preservação e freqüentes transferências podem apresentar pleomorfismos, mudanças morfo-fisiológicas e redução na patogenicidade. Todavia, nenhuma alteração pleomórfica foi detectada nas cepas aqui estudadas. Essa técnica tem mostrado boa capacidade de manter inalteradas às características morfológicas dos isolados estocados por longo tempo. Capriles *et al.* (1989) informaram ter recuperado uma cepa de *Trichophyton tonsurans* não-pleomorfizada após 20 anos de estocagem em água destilada. Supressão do pleomorfismo e manutenção da capacidade de reprodução sexuada foram relatadas por McGinnis *et al.* (1974) para diversas cepas armazenadas por esta técnica. Capriles *et al.* (1993), trabalhando com cepas de *Sporothrix schenckii* preservadas em água destilada por um período de 13 a 16 anos, informaram também a efetividade da técnica na manutenção da patogenicidade das cepas. Comparando com as técnicas de congelamento e subsequente estocagem em nitrogênio líquido (Hwang, 1966) e liofilização (Rybníkář, 1995), a água destilada apresenta algumas vantagens. É um procedimento pouco laborioso, de baixo custo e que requer pequeno espaço para a estocagem das amostras (Boesewinkel, 1976; Borman *et al.*, 2006). Além disso, o rendimento obtido com a preservação de cepas em água destilada pode superar aqueles obtidos com técnicas mais caras e sofisticadas como a liofilização (Qiangqiang *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS

- Baker, M & Jeffries, P. Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophytes fungi. *Jour. Clin. Microbiol.* 44 (2): 617-618, 2006.
- Bakerspiegel, A. Soil as a storage medium for fungi. *Mycologia.* 45: 596-604, 1953.
- Bistis, GN. Pleomorphism in the dermatophytes. *Mycology.* 51: 440-452, 1959.
- Boesewinkel, HJ. Storage of fungal cultures in water. *Trans. British Mycol. Soc.* 66(1): 183-185, 1976.
- Borman, AM; Szekeley, A; Campebell, CK & Johnson, EM. Evaluation of viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 161: 361-368, 2006.
- Brilhante, RS; Cavalcante, CS; Soares-Junior, FA; Monteiro, AJ; Brito, EH; Cordeiro RA et al. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. *Med. Mycol.* 42: 499-504, 2004.
- Castellani, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42: 225-226, 1939.
- Castellani, A. Further research on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathol. et Mycol. Appl.* 20:1-2, 1963
- Castellani, A. A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Jour. Trop. Med. Hyg.* 70: 181-184, 1967.
- Capriles, CH; Essayag, SM; Lander, A & Camacho, R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia.* 122: 129-133, 1993.
- Capriles, CH; Mata, S & Middelveen, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 106: 73-79, 1989.
- Deshmukh, SK. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses.* 46: 203-207, 2003.
- Ellis, JJ. Preserving fungus strains in sterile water. *Mycology.* 71: 1072-1075, 1979.
- Gentle, JC & Scott, E. The preservation of medically important fungi. *Sabouraudia.* 17(4): 415-418, 1979.
- Grivell, AR & Jackson, JF. Microbial culture preservation with silica gel. *Jour. Gen Microbiol.* 8: 423-425, 1969.
- Heckly, RJ. Preservation of microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* 24: 1-53, 1978.
- Hwang, SW. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* 14(5): 784-788, 1966.
- Kane, J; Summerbell, R; Sigler, L; Krajden, S & Land, G. Laboratory handbook of dermatophytes. Belmont, CA: Star Publishing Company. 1997, pp.1-344.
- Komaid, AG. Viability of fungal cultures after ten years of storage in sterile distilled water at room temperature. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 30: 219-221, 1988.
- McGinnis, MR; Padhye, AA & Ajello, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeast and some aerobic actinomycetes in sterile water. *Appl. Microbiol.* 28 (2):218-222, 1974.
- Neufeld, PM & Sarquis, MIM. [Laboratory preservation of filamentous fungi by mineral oil method]. *Rev. Bras. An. Clin.* 35(3): 147-150, 2003.
- Odds, FC. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeast in water. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 413-415, 1991.
- Passarelli, L & McGinnis, M. Viability of fungus cultures maintained at -70oC. *Jour. Clin. Microbiol.* 30(4): 1000-1004, 1994.
- Qiangqiang, Z; Jiajun, W & Li, L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses.* 255-257, 1998.
- Rebell, G & Taplin, D. Dermatophytes. Their Recognition and Identification. Florida: University Miami Press. 1979, pp. 1-124.
- Riddel, RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.* 42: 265-270, 1950.
- Rybníkář, A. Long-term maintenance of lyophilized fungal cultures of the genera *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Paecilomyces* and *Trichophyton*. *Mycoses.* 145-147, 1995.
- Smith, D & Onions, HS. A Comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81(3): 535-540, 1983.
- Stalpers, JA; De Hoog, A & Vlug, IJ. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia.* 79: 82-89, 1987.
- Weitzman, I. Variations in *Microsporum gypseum* – I. A genetic study of pleomorphism. *Sabouraudia.* 3(3): 195-204, 1964.
- Weitzman, I & Summerbell, RC. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(2): 240-259, 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prevalência da anemia e deficiências nutricionais, através de diferentes parâmetros laboratoriais, em mulheres grávidas atendidas em dois serviços de saúde pública no Rio Grande do Sul

Anemia prevalence and nutritional deficiencies, through different laboratory parameters, in pregnant women assisted in two services of public health in Rio Grande do Sul

Caroline Dani¹, Simone Rossetto¹, Simone M Castro² & Sandrine C Wagner¹

RESUMO - A anemia é um estado caracterizado pela redução nos parâmetros hematológicos, entre eles hemoglobina e hematócrito, a qual pode ser ou não seguido pela deficiência de micronutrientes essenciais, entre eles ácido fólico, a vitamina B12 e/ou o ferro. Entretanto, esta deficiência é um problema ao diagnóstico correto da anemia, desde que este estado é caracterizado por ajustes fisiológicos a fim fornecer uma adaptação melhor ao bebê. Neste estudo foram avaliadas 102 gestantes, de períodos gestacionais diferentes, atendidas em serviços públicos do Rio Grande do Sul. Este estudo teve por finalidade pesquisar os níveis de anemia através de exames laboratoriais, os quais buscaram avaliar os parâmetros hematológicos, bem como dosar as quantidades de ferro, vitamina B12 e ácido fólico. Através dos resultados pode-se observar que apenas 13,6% das grávidas foram consideradas anêmicas, quando utilizado valor de hemoglobina inferior a 11g/dl. Entretanto quando avaliada a deficiência de ferro, 38,2% foram consideradas ferropênicas, utilizando-se valores de ferritina inferiores a 15 ng/ml. Apesar de mais estudos serem necessários, estes resultados mostram que sempre quando avaliada a anemia em gestantes, deve-se optar por mais de um método laboratorial, a fim de melhorar a qualidade de vida tanto da mãe quanto do bebê.

PALAVRAS-CHAVE - gestantes- anemia- micronutrientes- deficiência – ferro- vitamina B12- ácido fólico

SUMMARY - Anemia is a state characterized by the reduction in haematologic parameters, i.e. hemoglobin and hematocrit, which can or not be followed by the deficiency of essential micronutrients, i.e. folic acid, vitamin B12 and/or iron. However, this deficiency is a problem to the correct diagnosis of anemia, since this state is characterized by physiological adjustments in order to supply a better adaptation to the baby. In this study 102 pregnant women were evaluated, from different pregnancy periods, assisted in public services of the Rio Grande do Sul. The purpose of this study was to search the levels of anemia by means of laboratorial examinations, through haematologic parameters, as well as dosing the amounts of iron, B12 vitamin and folic acid. Through the results it can be observed that only 13.6% of the pregnant were considered anemic, when used hemoglobin values < 11g/dl. However when evaluated the iron deficiency, 38.2% were considered deficient in iron, using inferior values of ferritin < 15 ng/ml. Although more studies are necessary, these results show that always when anemia is evaluated in pregnancy women, it must be chosen more than one laboratorial method, in order to improve mother's and baby's quality live.

KEYWORDS - pregnant women- anemia- micronutrients – deficiency – iron – vitamin B12 – folic acid;

INTRODUÇÃO

A anemia, situação caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina (Hb) com uma diminuição conseqüente no nível de hematócrito (Hct), é uma alteração comum que geralmente complica as gestações e está relacionada, principalmente, com a deficiência de alguns micronutrientes, entre eles o ferro (Fe), vitamina B₁₂ (Vit B₁₂) e/ou Ácido fólico (Ac.Fol), causada pelo aumento da exigência destes minerais (BASHIRI, 2003; XIONG, 2003; HESS, 2001).

As gestantes constituem um dos grupos mais vulneráveis para deficiência de ferro. É sabido que variáveis como níveis de hemoglobina, peso ao início do acompanhamento pré-natal, idade materna, número de filhos anteriores e idade gestacional, podem influenciar nos valores a serem avaliados para o grau de anemia entre as gestantes e, assim, serem responsáveis por casos mais graves de anemia (PAPA ESPOSITO, 2003; BRITTENHAM, 2000; OPS, 1996). A gestação está associada a ajustes fisiológicos e anatômicos que acarretam acentuadas mudanças no organismo materno, incluindo a composição dos elementos figurados do sangue circulante (BASHIRI, 2003; GUERRA, 1992). Pode-se considerar a gravidez como um estado biológico de profunda repercussão hemodinâmica, juntamente com a formação da unidade feto-placenta, os quais põem em prova os diferentes sistemas orgânicos da mulher (GUERRA, 1992; MARQUES, 2002).

Estudos demonstraram que, quando a gravidez ocorre em mulheres com reservas suficientes para atender as necessidades da formação da placenta e do feto, o organismo se mantém em equilíbrio, não ocorrendo o mesmo com aquelas que apresentam poucas reservas de Fe, Fol e vit B₁₂, as quais facilmente se tornam anêmicas (GUERRA, 1992; MARTÍ, 2001). Do ponto de vista da necessidade orgânica de Fe, o período gestacional é o mais crítico, pois a demanda total do mineral é cerca de 1000 mg, aumentando de 0,8 mg/dia no primeiro trimestre para 6,3 mg/dia no segundo e terceiro trimestres. Ma *et al.*, 2004, comprovou em seu trabalho que o último trimestre é caracterizado por uma deficiência de múltiplas vitaminas, além do Fe. Embora parte dessa elevada demanda seja compensada pela amenorréia e pelo aumento na absorção intestinal de ferro, a necessidade é tão elevada que dificilmente pode ser preenchida apenas com o ferro alimentar (FUJIMORI, 2000).

Sendo assim, a suplementação com ferro geralmente é recomendada durante gravidez para satisfazer as necessidades férreas de mãe e feto. Segundo Scholl, 2005, quando não descoberta cedo, a anemia por deficiência de ferro está associada com um aumento de duas vezes a ocorrência de aborto. Resultados de recentes tentativas clínicas randomizadas nos Estados Unidos e no Nepal que envolveram suplementação precoce com ferro, proporcionaram a redução no risco de baixo peso ao nascimento (SCHOLL, 2005).

Recebido em
Aprovado em

Centro Universitário Feevale- Instituto de Ciências da Saúde – Laboratório de Biomedicina. ¹Centro Universitário Feevale; ²Faculdade de Farmácia; UFRGS.

Durante a gravidez, há um aumento de 16% na demanda de oxigênio, levando a um aumento na atividade da eritropoetina (EPO), sendo esse aumento fisiológico. Dessa maneira, ocorre uma moderada hiperplasia eritróide na medula óssea (MO) e discreta elevação dos reticulócitos com sobrevida reduzida (REZENDE, 1999). Devido a este aumento, ocorrem alterações hematológicas, que respondem ao ajuste fisiológico ocorrido nesta fase. Entre estas alterações está a elevação do volume sanguíneo total em cerca de 40 a 50%, como decorrência do aumento tanto do volume plasmático quanto da massa total de eritrócitos e leucócitos na circulação. Porém, o aumento não é proporcional, necessitando mecanismos de controle. Assim, alguns parâmetros que avaliam a série vermelha (Hb, Hct e Rbc) mostram-se reduzidos a partir do 2º trimestre de gestação e não podem ser interpretados sem prévio conhecimento do estado nutricional materno, o qual é possível avaliar com a utilização de parâmetros que quantificam os micronutrientes essenciais (MARQUES, 2002; PIATO, 1995; CHOI, 2001; SHARMA, 2003).

O volume plasmático eleva-se progressivamente a partir da sexta semana, aumentando 50% em todo período. Expande-se mais rapidamente durante o 2º trimestre, alcançando um pico na 24ª semana. Entre 32ª e 34ª semanas ocorre uma estabilização deste volume (PIATO, 1995; CHOI, 2001; VITERI, 1999).

Assim, a partir da 16ª a 20ª semana, o volume plasmático faz uma hemodiluição, sendo uma adaptação às necessidades do transporte de oxigênio para o feto, uma vez que a diminuição do Hct reduz a viscosidade sanguínea e, conseqüentemente, à resistência vascular periférica (CHOI, 2001; MAHAJAN, 2004). Porém, por muitas vezes, essa hemodiluição necessária é confundida com um estado patológico e tratada como tal, gerando um tratamento desnecessário (MARQUES, 2002).

Nos países em desenvolvimento, as taxas globais de fecundidade, mortalidade infantil e mortalidade materna são elevadas, quando associadas a anemias carenciais (PIATO, 1995; BECERRA, 1998; PAIVA, 2003; CARVAJA-MARTÍ, 2002; ALLEN, 2000). Além da mortalidade materna e fetal, devido ao estado anêmico instalado, outras situações como crescimento intra-uterino retardado, presente principalmente em gestantes mal-nutridas (MAHAJAN, 2004). A prevalência dessas anemias apresenta frequência 2 a 3 vezes maior no sexo feminino do que no sexo masculino e nas grávidas o acréscimo é de 20 vezes (REZENDE, 1999), sendo responsável por 40-45% dos casos de mortalidade materna e também considerada como o problema hematológico mais freqüente no ciclo gestativo (REZENDE, 1999; CHOI, 2001; BECERRA, 1998; PAIVA, 2003; ALLEN, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como estado anêmico quando houver uma concentração de hemoglobina inferior a 11g/dl^{1,2,3,9,12,13,20,21,24} e pode ser classificada da seguinte forma: grave (< 7g/dl), moderada (de 7 a 9 g/dl) e leve (>9 a <11 g/dl) (GUERRA, 1992; BECERRA, 1998; PAIVA, 2002; CASANUEVA, 2003).

No Brasil, mostrou-se que as prevalências de anemias em gestantes, embora muito diferentes nas diversas regiões do país, e nas diferentes décadas (28 a 38% na década de 70, 14 a 65% na década de oitenta e 29 a 52% na década de 90) são muito elevadas, constituindo uma das mais importantes deficiências nutricionais ao lado da desnutrição protéico-energética (FUJIMORI, 2000). Valores estes considerados baixos se comparados com os encontrados na Índia, onde estes chegam a 96% das mulheres grávidas (SHARMA, 2003).

O objetivo deste trabalho foi de estudar a prevalência de anemia em gestantes que faziam parte do serviço pré-natal de dois serviços de saúde desta região, da qual poucos registros foram feitos, e assim avaliar se o estado anêmico provém da mudança fisiológica ou da carência de micronutrientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram avaliadas 102 mulheres grávidas, que faziam parte da demanda espontânea de dois serviços de atendimento pré-natal no Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil. Para obtenção de informações como idade, tempo gestacional, número de filhos, fumo, medicação e suplementação alimentar, aplicou-se um questionário no momento da coleta. Após as devidas explicações da natureza do experimento e obtidas as autorizações das gestantes, foram colhidos 8 ml de sangue por punção venosa, sendo separado em duas alíquotas, a saber, 4 ml em tubo com EDTA para realização do hemograma e 4 ml em tubo seco para as dosagens de folato, ferritina, vitamina B12, capacidade de ligação do ferro e ferro sérico. Após a formação e retração do coágulo, centrifugou-se o soro, o qual foi acondicionado em Eppendorf e armazenado a -50°C até o momento da realização dos testes.

Metodologias Laboratoriais

Para o conhecimento das reservas de micronutrientes foram determinadas as concentrações de ferritina sérica (FS), ácido fólico e vitamina B12 utilizando-se o método da quimioluminescência (ACCESS®).

Para a determinação dos valores da capacidade de ligação do ferro foi utilizada a metodologia de Goodwin modificado, por técnica manual, utilizando Kits Labtest. Os resultados obtidos possibilitaram calcular a capacidade latente de ligação do ferro e, juntamente com o valor do Ferro sérico (valores em µg/dl), também dosado nestas amostras por método colorimétrico, pode-se determinar a capacidade total de ligação do ferro (CTLF, valores em µg/dl).

Através das dosagens CTLF, foram calculados os valores da capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), sendo que este valor, juntamente com as dosagens de ferro sérico, possibilita calcular vários outros parâmetros que auxiliaram no diagnóstico de uma real deficiência de ferro no organismo destas gestantes, segundo as seguintes fórmulas (SOARES, 2002):

Capacidade total de ligação ao ferro (CTLF): CLLF + FeS (µg/dl)
Índice de saturação da transferrina (IST): FeS/CTLF x 100 (%)
Os parâmetros hematológicos (HCT, RBC, VCM, HCM, CHCM e RDW) foram obtidos de contador de células automático (ADVIA 60®).

Segundo a OMS, considera-se haver deficiência de ferro em gestantes quando a concentração deste for inferior a 50µg/dl e/ou saturação da transferrina inferior a 15%; deficiência de ácido fólico, inferior a 3 ng/ml, e deficiência de vitamina B12, inferior a 80 pg/ml (MARQUES, 2002). Se utilizados como parâmetros Hb e Hct, segundo a OMS, são consideradas anêmicas, as gestantes com Hb < 11 g/dl e Ht < 33% (MARTÍ, 2001).

Neste trabalho, para caracterização do estado nutricional de ferro, foram consideradas ferro depletadas, de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante, todas as gestantes com valores de ferritina sérica inferiores a 15 ng/ml, CLLF superior a 280µg/dl, CTLF superior a 410 µg/dl, IST inferior a 20% e/ou ferro sérico inferior a 60 µg/dl.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Universitário Feevale. Os dados foram inseridos e analisados através dos programas estatísticos SPSS versão 10.0 for Windows.

RESULTADOS

As gestantes foram classificadas de acordo com o trimestre gestacional, sendo que das 102 gestantes, 10 estavam no primeiro, 52 no segundo e 40 no terceiro trimestre, respectivamente. A média de idade das gestantes foi de $25,1 \pm 6,4$ anos, sendo que houve diferença estatística entre as médias das idades das gestantes nos três trimestres.

Os valores dos parâmetros laboratoriais que caracterizam o estado nutricional de ferro e da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ nas gestantes analisadas, segundo o trimestre gestacional estão apresentados na tabela 1.

TABELA I
Distribuição dos valores de FS, FeS, Hb e Hct, Ac.Fol. e Vit. B12, segundo idade gestacional ($x \pm DP$).

Idade gestacional	FS (μ l)	FeS (mg/dl)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Ac. Fol. (ng/mL)	Vit. B12 (pg/mL)
1º trimestre	46,4 $\pm$ 35,9 ^a	121,39 $\pm$ 39,2	11,9 $\pm$ 0,8	34,7 $\pm$ 2,2	4,09 $\pm$ 0,39 ^a	313,9 $\pm$ 42 ^a
2º trimestre	59 $\pm$ 59 ^a	107,8 $\pm$ 61,4	11,8 $\pm$ 0,9	34,6 $\pm$ 2,6	3,89 $\pm$ 0,28 ^a	232,73 $\pm$ 12,4 ^a
3º trimestre	24,2 $\pm$ 29,8 ^b	113,9 $\pm$ 64,7	11,7 $\pm$ 0,8	34,4 $\pm$ 2,3	2,90 $\pm$ 0,18 ^b	264,17 $\pm$ 63,71 ^b

FS: ferritina sérica; FeS: ferro sérico; Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; Ac. Fol.: ácido fólico; Vit.B12: vitamina B12. Letras distintas diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis, para p<0,05.

Observa-se que as médias de todos os parâmetros determinados na tabela 1 foram menores com o decorrer da gestação, sendo que os valores de FS, ácido fólico e vitamina B₁₂ apresentaram significância estatística (p<0.05) quando comparados os valores de acordo com o trimestre. A fim de caracterizar o estado anêmico, os índices modificam de acordo o parâmetro laboratorial escolhido (Tabela2).

TABELA II
Percentual de gestantes anêmicas segundo diferentes parâmetros laboratoriais.

	Percentual de gestantes anêmicas segundo o trimestre			
Parâmetros laboratoriais	1º	2º	3º	Percentual total de gestantes anêmicas (%)
Hb <11g/dl	10	13,2	17,5	13,9
Hct <33%	10	20,8	30	23,3
FeS<60mg/dl	0	21,7	10,8	15,2
CTLF >410mg/dl	85,7	58,7	18,9	44,4
IST<20%	0	41,3	56,8	44,9
FS < 15 mg/dl	22,2	24,5	60	38,2

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; FS: ferritina sérica; CTLF: capacidade total de ligação ao ferro; IST: índice de Saturação a transferrina; FeS: ferro sérico.

Utilizando como parâmetro o Hct <33 %, observou-se que a maioria das anêmicas se encontrava no terceiro trimestre (30%) e, avaliando os parâmetros utilizados na caracterização da ferropenia, observou-se que o IST esteve também diminuído, sendo que 56,8% das gestantes do terceiro trimestre apresentavam este parâmetro em níveis reduzidos, concordando como os valores encontrados pelo Hct.

Caracterizando-se a gravidade da depleção de ferro com a utilização dos critérios recomendados pela Organização Panamericana de La Salud (OPS, 2004), verificou-se que 15,2% das gestantes apresentavam algum tipo de carência relacionada ao ferro quando usados os valores de ferro sérico e 38,2 % quando utilizados valores de ferritina sérica. Para caracterizar estado ferropênico através da CTLF, foi observado que 55,6 % eram anêmicas (tabela 3), havendo diferenças segundo trimestre gestacional, sendo que por mais estes critérios comprovou-se que a carência nutricional agrava-se com o aumento do período gestativo (tabela 3).

TABELA III
Distribuição dos valores médios de CTLF, IST, e FeS segundo idade gestacional ($x \pm DP$).

Idade gestacional	CTLF (μ l)	IST (%)	FeS (mg/dl)
1º trimestre	426,25 $\pm$ 22,76 ^b	28,75 $\pm$ 4,43 ^b	123,9 $\pm$ 39,2
2º trimestre	392,62 $\pm$ 21,8 ^b	22,37 $\pm$ 2,37 ^a	107,8 $\pm$ 61,4
3º trimestre	504,64 $\pm$ 16,82 ^a	25,20 $\pm$ 3,10 ^a	113,9 $\pm$ 64,7

CTLF: capacidade total de ligação ao ferro; IST: índice de Saturação a transferrina; FeS: ferro sérico. Letras distintas diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis, para p<0,05.

Além da estratificação do valor dos parâmetros por trimestre gestacional, comparou-se os valores de Hb (inferior ou superior a 11g/dl) com os mesmos parâmetros citados acima, para verificar se a dosagem isolada de hemoglobina é capaz de indicar as pacientes portadoras de ferropênicas. Ressalta-se que, quando a Hb encontra-se diminuída, a deficiência de ferro já se encontra instalada, sendo este o último parâmetro a se alterar (tabela 4).

TABELA IV
Correlação entre diagnóstico de anemia pelo nível de hemoglobina e o estado de carência nutricional em prestando-se como critério os níveis de FS, FeS, IST e Ac.Fol nas gestantes.

Hb	FS (mg/l)	FeS(mg/dl)	IST (%)	Ac.Fol (ng/mL)
< 11 g/dl	24,69 $\pm$ 9,97 ^a	70,63 $\pm$ 11,54	15,67 $\pm$ 2,73 ^a	2,57 $\pm$ 0,36 ^a
^a 11 g/dl	46,80 $\pm$ 6,20	149,0 $\pm$ 33,19	25,78 $\pm$ 2,05	3,63 $\pm$ 0,17

FS: ferritina sérica; FeS: ferro sérico; Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; Ac. Fol.: ácido fólico; Vit.B12 vitamina B12.* Diferença estatística ps0,05, pelo teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

Várias são as metodologias capazes de avaliar o estado anêmico em gestantes. Neste estudo, considerando como parâmetro níveis de hemoglobina <11g/dl, a anemia esteve presente em 13,6 % das gestantes avaliadas. Este valor é semelhante ao encontrado em outro estudo realizado por Fujimori (2000), onde 13,9 % encontravam-se anêmicas. No grupo estudado, a menor ocorrência apareceu naquele composto pelas gestantes do primeiro trimestre, onde o estado anêmico foi constatado em apenas 10% dessas gestantes. Ressalta-se que o menor valor encontrado foi 9,6 g/dl, permitindo a identificação dessas pacientes como portadoras de anemia em grau leve.

Utilizando como significância valores de p<0,05, observou-se que dois valores que caracterizaram a deficiência de ferro nas gestantes, se mostraram significantes estatisticamente, quando comparados com o trimestre gestacional, sendo eles o nível de ferritina (<15 μ g/l) e o nível de IST

(<20%). Estes valores concordam com Guerra (1992), onde apresenta que os valores de IST decaem com o decorrer da idade gestacional. Essa idéia fica mais fidedigna se utilizarmos os valores de CTLF, os quais demonstram a porcentagem de gestantes com valores superiores ou iguais a 410 µg/dl se eleva com o passar do período gestacional, índices esses que concretizam a instalação da ferro-deficiência. Os demais índices, apesar de apresentarem variações de acordo com o trimestre gestacional, não demonstraram significância estatística.

Para avaliação das reservas de ferro, a dosagem de ferritina tem sido considerada um dos melhores métodos de escolha. Neste estudo, foram consideradas ferro-depletadas gestantes com valores de ferritina <15µg/l. Assim, 38,2% foram consideradas ferropênicas segundo este parâmetro, apresentando índices diferentes segundo o trimestre gestacional, resultado que corrobora com os encontrados por Fujimori (2000). Observou-se que em poucas gestantes que se mostraram anêmicas (Hb<11 g/dl), apresentavam ferro sérico <60µg/dl, sendo estas apenas 21,4%. Este achado pode ser explicado já que medidas de ferro podem variar, estando falsamente elevados em gestantes que fazem uso de suplementação férrea, ou uso de anticoncepcional oral ou amostras hemolisadas (SOARES, 2002)

Neste estudo, os parâmetros utilizados na avaliação da deficiência de micronutrientes essenciais (ferro, folato e vitamina B₁₂) mostraram que a deficiência geralmente instala-se antes mesmo que os valores de Hb se apresentem diminuídos. Esse fator gera um questionamento, já que segundo Papa Esposito (2003), a Hb é o único parâmetro rotineiramente utilizado no serviço público pré-natal, concluindo-se, assim, que as grandes maiorias das gestantes deficientes não seriam detectadas. Assim é sugerido que a Hb não é um parâmetro que deve ser utilizado sozinho, sendo sempre necessária a utilização de outros dados que melhor detectariam a deficiência destes micronutrientes tão importantes.

Também, é importante salientar que, segundo Xiong (2003), as dosagens de Hb podem ser afetadas pela suplementação de ferro e folato, os quais são rotineiramente prescritos para grávidas em muitos países industrializados. Porém, em países como a China, onde o estudo foi realizado, a suplementação é prescrita na rotina clínica do serviço pré-natal somente quando detectada a depleção (Ma, 2004; MUKHOPADHYAY, 2004; MÜNGEN, 2003).

Torna-se importante ressaltar que quando supridas as necessidades férreas, caso ainda se prossiga com a suplementação, corre-se o risco de gerar nestas gestantes complicações, como por exemplo, a diabetes gestacional, e ainda um aumento no nível do estresse oxidativo, devido a participação do ferro em excesso na Reação de Haber-Weiss/Fenton, a qual forma o radical hidroxila (OH•), sendo este um radical extremamente reativo e lesivo às células (SCHOOLL, 2005; BABIOR, 1997).

Observou-se, então, que, apesar dos índices de gestantes anêmicas não serem elevados, a carência nutricional pode ser observada mesmo quando essas gestantes ainda não se apresentam anêmicas segundo valores de Hb e Hct. Utilizando os parâmetros que avaliaram a deficiência dos micronutrientes essenciais, observou-se que a carência, geralmente, não está instalada ao início da gestação, se concretizando com o passar dos meses, gerados pela deficiência causada pelas necessidades requeridas pelo feto ou pelo ajuste hemodinâmico presente em todos os processos gestativos.

As anemias carenciais, principalmente a ferropriva, têm consequências importantes para a saúde pública, já que causam transtornos no desenvolvimento psicomotor e das

funções cognitivas em pré-escolares, reduz o rendimento de trabalho nos adultos, e aumenta a frequência de baixo peso ao nascer, de parto pré-maturo e de mortalidade perinatal (BASHIRI, 2003). A avaliação correta da depleção dos estoques de ferro durante a gravidez permite ao obstetra instalar e monitorizar adequadamente sua suplementação antes do final da gestação (WALTER, 2002; ANDREWS, 2000; BEARD, 2005; MASSOT, 2003).

AGRADECIMENTOS

Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde. Curso de Biomedicina, Laboratório de Biomedicina.

REFERÊNCIAS

- Allen, LH. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*:71: 1280-84, 2000.
- Allen, L; Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *J Nutr*: 132:813-19, 2000.
- Andrews, NC; Disorders of iron metabolism. *New Engl J Med*: 26: 342:5; 2000.
- Babior, BM; Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res*: 30(2): 141-1551, 1997.
- Bashiri, A, Burstein, E, Sheiner, E, Mazor, M; Anemia during pregnancy and treatment with intravenous iron: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*: 110(1):2-7, 2003.
- Beard, JL; Hendricks, MK; Perez, EM; Murray-Kolb, LE; Berg, A; Vernon-Feagans, L; Irlam, J; Isaacs, W; Sive, A; Tomlinson, M; Maternal iron deficiency anemia affects postpartum emotions and cognition. *J Nutr*: 135: 267-72, 2005.
- Becerra, C; Gonzáles, G; Arturo, VA; Cruz, D; Florián, A; Prevalência de anemia em gestantes, hospital regional de Pucallpa, Peru. *Rev Panam Salud Publica*: 3:285-92, 1998.
- Brittenham GM; Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In: Hoffman R; Benz Jr EJ; Shattil SJ. et al. (eds.). *Hematology – basic principles and practice*. 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000.
- Carvaja-Martí, A; Peña-Martí, G; Comunian, G; Muñoz, S; Prevalence of anemia during pregnancy: results of valencia (venezuela) anemia during pregnancy study. *Arch Latinoam Nutr*: 52: 5-11, 2002.
- Casanueva, E; Viteri, F. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr*: 133(5 Suppl 2):1700S-1708S, 2003.
- Choi, J; Pai, S; Serum transferrin receptor concentration during normal pregnancy. *Ann Hematol*: 80(1):26-31, 2001.
- Fujimori, E; Laurent, D; Núñez De Cassana, LM; Oliveira, IV; Szarfarc, SC; Anemia e deficiência de ferro em gestantes adolescentes. *Rev Nutr*: 13: 177-84, 2000.
- Guerra, EM; Barretto, OCO; Pinto, AV; Castellão, K G; Prevalência de deficiência de ferro em gestantes de primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. *Rev Saúde Pública*:26(2):88-95, 1992
- Hess, S; Zimmermann, M; Brogli, S; Hurrell, R; A national survey of iron and folate status in pregnant women in Switzerland. *Int J Vitam Nutr Res*: 71: 268-73, 2001.
- Ma, AG; Chen, XC; Wang, Y; Xu, RX; Zheng, MC; Li, JS; The multiple vitamin status of Chinese pregnant women with anemia and nonanemia in the last trimester. *J Nutr Sci Vitaminol*: 50: 87-92, 2004.
- Mahajan, SD; Singh, S; Shah, P; Gupta, N; Kochupillai, N; Effect of maternal malnutrition and anemia on the endocrine regulation of fetal growth. *Endocr Res*: 30: 189-203, 2004.
- Marques, F; Mejía, R; García, R; Perfil hematológico durante el embarazo. *Ginecología y Obstetricia*: 70 (3): 36-40, 2002.
- Martí, A; Peña-Martí, G; Muñoz, S; Lanas, F; Comunian, G; Association between prematurity and maternal anemia in venezuelan pregnant women during third trimestre at labor. *Arch Latinoam Nutr*: 51(1): 44-48, 2001.
- Massot, C; Vanderpas, J; A survey of iron deficiency anaemia during pregnancy in Belgium: analysis of routine hospital laboratory in Mons. *Acta clin Belg*: 58: 169-77, 2003.
- Mukhopadhyay, A; Bhatla, N; Kriplani, A; Pandey, RM; Saxena, R; Daily versus intermittent iron supplementation in pregnant women: hematological and pregnancy outcome. *J. Obstet Gynaecol Res*: 30: 409-17, 2004.

- Mungen, E. Iron supplementation in pregnancy. *J Perinat Med*: 31(5): 420-6, 2003.
- Muslimatun, S; Schmidt, M; Schultink, W; West, C; Hautvast, J; Gross, R; Weekly supplementation with iron and vitamin a during pregnancy increases hemoglobin concentration but decrease serum ferritin concentration in Indonesian pregnant women. *J Nutr*: 131:85-90, 2001.
- OPS. Organizacion panamericana de la salud. Plan de acción para el control de la anemia por carencia de hierro en las américas. Washington DC, 1996.16p.
- Paiva, A; Rondó, P; Guerra-Shinohara, E; Silva, C. The influence of iron, vitamin B12 and folate levels on soluble transferrin receptor concentration in pregnant women. *Clin Chim Acta*: 334: 197-303, 2003.
- Paiva, A.; Rondo, P; Guerra-Shinohara; Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Rev Saúde Pública*: 34: 421-6, 2002.
- Papa Esposito, AC, Furlan, JP; Pasquella,M; Guazzelli,CAB; Figueiredo, MS; Camano,L; Mattar, R. A anemia por deficiência de ferro na grávida adolescente - comparação entre métodos laboratoriais. *RBGO*: 25: 731-38, 2003.
- Plato, S; Complicações no ciclo gravídico-puerperal: Rio de Janeiro, Atheneu, 1995.
- Rezende, J; Montenegro; C: *Obstetrícia fundamental*: 8ª ed: Rio janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- Scholl, O T; Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am J Clin Nutr*: 81: 1218-22, 2005.
- Sharma, JB; Soni, D; Murthy, NS; Malhotra, M; Effect of dietary habits on prevalence of anemia in pregnant women of Delhi. *J Obstet Gynaecol Res*: 29: 73-8, 2003.
- Soares, JF: *Métodos diagnósticos*: Porto Alegre, Artmed Editora, 2002.
- Viteri, F; Ali, F; Tujague, J; Long-term weekly iron supplementation improves and sustains nonpregnant women's iron status as well or better than currently recommended short-term daily supplementation. *J Nutr*: 129:2013-20, 1999.
- Walter, P; Knutson, M; Martinez, A; Lee, S; Xu, Y; Viteri, F; Ames, B; Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *PNAS*: 19 (99): 2264-69, 2002.
- Xiong, X; Buekens P; Fraser W, Guo Z; Anemia during pregnancy in a chinese population. *Int J Gynecol Obstet*: 83:159-64, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Caroline Dani
 RS 239, 2755. Novo Hamburgo
 CEP. 93352-000 RS
 Fone/Fax: (51)3586-8800.
 E-mail: carolinedani@yahoo.com.br

Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial - Revisão

Lymphatic Filariasis: Progresses and Perspectives of the Laboratorial Diagnostic – A Review

Eduardo Caetano Brandão F. da Silva¹; Maria Almerice Lopes da Silva² & Paula Alexandra dos S. Oliveira³

RESUMO - A Filariose Linfática, também conhecida como elefantíase em sua fase crônica, é uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais que possui como agente etiológico helmintos da espécie *Wuchereria bancrofti*. Enfermidade debilitante, de grave impacto sócio-econômico, acomete cerca de 120 milhões de pessoas em todo mundo. No Brasil, estima-se em 49 mil o número de indivíduos infectados, sendo estes encontrados principalmente no município de Maceió-AL e Região Metropolitana do Recife-PE. A dificuldade na realização do diagnóstico, a falta de saneamento básico e a alta densidade populacional de vetores fazem desta infecção uma endemia de difícil controle e erradicação, sendo, por esse motivo, alvo de inúmeros programas propostos pela OMS e OPAS. Associadas a esses programas, pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de avaliar as técnicas atualmente disponíveis, bem como desenvolver novos métodos de diagnóstico mais sensíveis e mais específicos, possibilitando assim uma redução no número de indivíduos com formas mórbidas da doença. O objetivo do presente trabalho é fornecer informações relevantes acerca das técnicas disponíveis para o diagnóstico da Filariose Linfática, contribuindo assim para otimização dos laboratórios de análises clínicas.

PALAVRAS-CHAVE - Filariose Linfática, *Wuchereria bancrofti*, Diagnóstico.

SUMMARY - Lymphatic Filariasis, also known as elephantiasis in your chronic phase, it is an endemic disease of tropical and subtropical areas that has the *Wuchereria bancrofti* helminthes which agent etiologic. Illness weakling of serious socioeconomic impact attacks about 120 million people in all the word. In Brazil, is possible that 49 thousand of individuals are infected, whose the majority live in the municipal district of Maceió and Recife Metropolitan Area. The difficulty in the development of the diagnosis, the lack of basic sanitation and the great population density of vectors they do of this infection an endemic disease of difficult control and eradication. Therefore this illness is target diverse WHO and OPAS programs. Together with the those programs, researches have been accomplished with the purpose of evaluating the techniques available in the moment, as well as to develop more sensitive and specific diagnosis methods, making possible a reduction in the number of individuals with morbid forms of the disease. The purpose of the present article is to supply important information about the available techniques for the diagnosis of Lymphatic Filariasis, contributing to optimization of the analyses clinical laboratories.

KEYWORDS - Lymphatic Filariasis, *Wuchereria bancrofti*, Diagnostic.

INTRODUÇÃO

A Filariose linfática causada pela *Wuchereria bancrofti* é uma doença negligenciada, de caráter debilitante, que acomete cerca de 120 milhões de pessoas em todo mundo (FONTES *et al.*, 2005). Essa enfermidade vem ocupando, há onze anos, o 2º lugar no *ranking* mundial das doenças incapacitantes (WHO, 1995). No Brasil, estima-se em três milhões a população que vive em áreas com risco de contrair a parasitose e em 49 milhões o número de infectados. Esses indivíduos residem, em sua maioria, em áreas urbanas dos estados de Alagoas (Maceió) e Pernambuco (Região Metropolitana do Recife – RMR). (MEDEIROS *et al.*, 2004).

O grave impacto sócio-econômico provocado pela bancroftose, em sua fase avançada, tem sido estudado por diversos pesquisadores, nas mais variadas localidades do mundo, onde a doença é endêmica (BABU & NAYAK, 2003). Em trabalhos realizados na Índia, por Ramaiah *et al.*, (2000) avaliou-se que a média dos custos anuais com o tratamento de casos crônicos foi calculada em cerca de R\$ 52 milhões. Dreyer *et al.*, (2005) relataram, ainda, que o forte estigma atribuído a essas pessoas, juntamente com a incapacidade física, faz com que estes se tornem excluídos das oportunidades de emprego.

Toda a problemática acima exposta encontra-se intimamente relacionada com a patogenia e manifestações clínicas que acompanham essa subestimada doença. Como em sua fase avançada a bancroftose não possui tratamento eficaz na redução de seus sinais, é importante que os infectados sejam diagnosticados o mais precocemente possível. Diante disto, o presente trabalho visa fornecer informações

relevantes acerca das técnicas disponíveis para o diagnóstico da Filariose Linfática, contribuindo assim para otimização dos laboratórios de análises clínicas e conseqüente minimização do impacto da bancroftose.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da bancroftose é particularmente difícil. Por possuir baixa sensibilidade e especificidade, necessita de uma confirmação laboratorial. No entanto, em área endêmica, a história clínica de febre recorrente associada com adenolinfangite, é um forte indicativo de infecção (FONTES, 1998).

O diagnóstico da filariose linfática causada pela *W. bancrofti* pode ser realizado por diferentes técnicas parasitológicas, imunológicas, moleculares e por imagem.

DIAGNÓSTICOS PARASITOLÓGICOS

Há várias décadas, a única prova conclusiva e comprobatória da infecção filarial tem sido o encontro de microfilárias no sangue periférico ou nos líquidos biológicos (urina, líquido hidrocelico, quilocelico ou sinovial) (ROCHA, 2004).

A pesquisa parasitológica pode ser realizada através de técnicas como a gota espessa de sangue, concentração de Knott e filtração de sangue em membrana de policarbonato, nas quais a coleta sanguínea deve ocorrer entre 23 - 01 h (DREYER *et al.*, 1996). Essas duas últimas são técnicas de concentração, que trabalham com um volume maior de sangue, aumentando sua sensibilidade em relação à gota espessa. Porém, em decorrência da dificuldade de execução e também

Recebido em
Aprovado em

^{1,2,3}Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz

de visualização das microfilárias, as técnicas quantitativas de Knott e filtração em membrana de polycarbonato não são utilizadas na rotina e em inquéritos epidemiológicos. No entanto, são bastante utilizadas no diagnóstico de casos individuais e no controle pós-tratamento (HINRICHSEN *et al.*, 2005).

Gota espessa

De acordo com OMS, o diagnóstico parasitológico se baseia na pesquisa de microfilárias no sangue periférico, colhido em horário compatível com a periodicidade do parasito na região. Entre as técnicas disponíveis, a mais utilizada em inquéritos epidemiológicos é a gota espessa de sangue (20 a 100 µL), colhido por punção capilar digital. Em seguida, a amostra é fixada, corada (eosina-Giemsa) e analisada em microscopia óptica. Essa técnica é particularmente importante para o diagnóstico específico em áreas onde ocorrem infecções mistas, pois a gota espessa possibilita a visualização da bainha, fato que difere a microfilária de *W. bancrofti* de outro filarídeos sanguíneos (SILVA *et al.*, 2004).

A técnica da gota espessa apresenta um baixo custo em comparação com outras mais avançadas, como a filtração de sangue em membrana de polycarbonato, o ensaio imunoenzimático e o ICT *card*. No entanto, sua baixa sensibilidade impede a utilização em situações em que os parasitados se mostram com baixa microfilarémia ou amicrofilarêmicos (SILVA *et al.*, 2004).

Concentração de Knott

A técnica descrita por Knott em 1939 foi o primeiro método a utilizar a concentração de sangue no diagnóstico filarial. Apesar de ser uma técnica descrita há mais de 60 anos, Melrose, em 2002, constatou que nos dias atuais, este método ainda permanece em uso em diversas áreas endêmicas do mundo. A técnica permite a utilização de 1 ml de sangue venoso diluído em 9 ml de formalina a 2 %. O sistema é submetido à agitação vigorosa, centrifugado a 2000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante removido e o sedimento lavado com formalina a 2%. Repete-se o procedimento até limpidez do sobrenadante, sendo este descartado e o sedimento distribuído em lâminas. O material é fixado, corado e analisado sob microscopia óptica.

Filtração em membrana de polycarbonato

Descrita por Bell, a técnica de filtração de sangue em membrana de polycarbonato foi introduzida em 1967. De custo elevado em relação aos métodos parasitológicos anteriormente descritos, baseia-se na passagem de sangue venoso através de uma membrana (Milipore ou Nuclepore) de diâmetro de 13 a 25 mm e poros de 5 ou 3 µm. Essa técnica, assim como a de Knott, permite a identificação de indivíduos com baixíssimas parasitemias (quantidade de microfilárias não-detectáveis pela técnica de gota espessa) (ROCHA, 2004).

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

O diagnóstico parasitológico da doença é particularmente difícil em pacientes que apresentam sintomas inflamatórios e se encontram na fase crônica, ou que apresentam quadro pulmonar (eosinofilia pulmonar tropical), situações nas quais as microfilárias estão normalmente ausentes do sangue periférico (SILVA *et al.*, 2004). Por essa razão avaliações imunológicas e de biologia molecular têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas.

Pesquisa de antígeno

Técnicas mais avançadas, que se baseiam na pesquisa de antígenos filarial circulantes, através de anticorpos monoclo-

nais, como o ensaio imunoenzimático (Og4C3-ELISA) e o teste de imunocromatografia rápida (ICT *card test*-AD12), mostraram sensibilidade e especificidade superior aos métodos parasitológicos (ROCHA, 2004). Trabalhos desenvolvidos em Maceió por Silva *et al.* (2004) relataram uma sensibilidade 4,5 vezes maior do ICT *card test*, quando em comparação com o método parasitológico da gota espessa de sangue (IC 95% 1,3 – 16,9). Em outro estudo, realizado na Região Metropolitana do Recife, por Rocha *et al.* (1996), avaliando a sensibilidade do Og4C3 frente a grupo de indivíduos amicrofilarêmicos e microfilarêmicos, portadores de vermes adultos detectados pela ultra-sonografia, verificaram que a sensibilidade variou 70 a 100%, respectivamente.

Um fator limitante na utilização desses testes é o custo elevado para obtenção dos Kits, o que restringe sua aplicação em serviços de saúde, onde a demanda é elevada. No entanto, por serem os mais promissores, servem de incentivo para que novos trabalhos sejam desenvolvidos no sentido de se pesquisar novos anticorpos.

O teste de Og4C3 foi o primeiro a tornar-se disponível comercialmente sob a forma de kit utilizando a técnica do ensaio imunoenzimático (Trop-Ag *W. bancrofti* ELISA kit, manufactured by JCU Tropical Biotechnology Pty. LTDA, Townsville, Queensland, Austrália) (TropBio 1996). Segundo More & Copeman (1990), o Og4C3 é um anticorpo IgM, produzido contra antígenos de *O. gibsoni*, um parasito bovino. Este anticorpo é também capaz de reconhecer antígenos circulantes que porventura se encontrem no soro ou plasma de indivíduos infectados pela *W. bancrofti* (ROCHA, 2004). A sensibilidade desse teste, de acordo com os achados de Lammie *et al.* (1994) é de 100 % quando se tem a filtração de sangue em membrana de polycarbonato como padrão ouro. Porém, uma redução na sensibilidade foi evidenciada por Rocha *et al.*, em 1996, quando estudavam indivíduos que possuíam menos de 1 microfilária/ml de sangue ou eram amicrofilarêmicos.

Apesar do avanço que foi a descoberta do Og4C3 para o diagnóstico da filariose linfática, a dificuldade de realização da técnica, bem como o custo, mostravam a necessidade de criação de métodos alternativos, mais práticos e de menor custo. Diante disso, o AD12, outro AcMo, foi sintetizado e disponibilizado sobre a forma de uma imunocromatografia rápida, permitindo o diagnóstico rápido da infecção.

Viabilizado sob forma de cartão, o diagnóstico que utiliza o AD12, imunoglobulina pertencente à classe das IgG, como captador de antígenos filariais circulantes, foi desenvolvido pela ICT Diagnostic (Balgowlah, New South Wales, Austrália). Atualmente, conhecido como BINAX (ICT "*card test*"), esse teste, segundo Weil *et al.* (1997), é capaz de reconhecer antígenos filariais de 200 KD. É um teste de imunodiagnóstico *in vitro* para detecção de antígenos de *W. bancrofti* em sangue total, plasma, soro e líquido célico. Baseia-se em uma interação que ocorre entre anticorpos monoclonal e policlonal, na presença de antígeno filarial circulante, que é revelada através de reação colorimétrica (WEIL *et al.*, 1997). O AD12 parece ter como propriedade a capacidade de reconhecer a presença de antígenos do parasito adulto, independente da presença ou ausência de microfilárias (ROCHA, 2004).

Ambos os testes, Og4C3 e AD12, podem ser realizados nos períodos diurno e noturno, fato que demonstra um grande avanço no diagnóstico da bancroftose. No entanto, o não conhecimento da cinética da antigenemia, após um tratamento antifilarial bem-sucedido, é um fator que necessita ser elucidado para que se possa melhorar o desempenho dos testes. Por esse motivo não devem ser utilizados como critério de cura (DREYER *et al.*, 2005).

Pesquisa de anticorpo

O uso de anticorpos como marcador de doença/infecção não devem ser feito na rotina/pesquisa, devido às evidências de que, mesmo se utilizando a pesquisa de isótopo IgG4, não é possível distinguir o quadro de eosinofilia pulmonar tropical de outras síndromes (*EPT-like*) produzidas por outros helmintos intestinais (HINRICHSSEN *et al.*, 2005).

Vários testes para detectar a resposta imune do tipo humoral utilizando a intradermoreação, disponível há mais de sessenta anos (FAIRLEY, 1937), bem como os testes sorológicos que vêm sendo utilizados ao longo dos últimos vinte anos, têm produzido interpretações conflitantes no diagnóstico laboratorial da bancroftose (AMBROISE-THOMAS, 1974, VOLLER & SAVIGNY, 1981, DREYER *et al.*, 1991, ROCHA, 1995). Possivelmente, isto é devido à baixa especificidade que estes testes apresentam (ROCHA, 2000) ou, ainda, em decorrência da utilização de extratos brutos dos parasitos homólogos (por exemplo, a imunofluorescência [IMF] para *W. bancrofti*) ou heterólogos (imunoenzimáticos [ELISA] com vermes adultos de *B. malayi*). Isso provoca geralmente reações cruzadas com outras infecções, fazendo com que a especificidade do teste seja prejudicada (ROCHA, 1995).

Algumas reações cruzadas são observadas também nas pesquisas que envolvem anticorpos policlonais contra *W. bancrofti*, a utilização de antígenos purificados certamente elevaria o grau de segurança dos testes que buscam identificar anticorpos específicos. (RAMZY *et al.*, 1995).

Outro teste sorológico para filariose linfática, baseado na pesquisa de anticorpos pelo antígeno recombinante filarial Bm14, foi desenvolvido podendo ser realizado a qualquer hora do dia (CHANDRASHEKAR *et al.*, 1994). Este antígeno foi selecionado de uma biblioteca de expressão de cDNA de *B. Malayi*, denominado gene *sxp-1*, sendo reconhecido no soro de pacientes com filariose linfática mas não em pacientes com infecção por helmintos não filariais. Estudos preliminares com soro de pacientes da Índia indicaram que o ELISA baseado na detecção de anticorpos IgG4 para Bm14 parece apresentar uma alta sensibilidade para o diagnóstico de pacientes com filariose por brugia ou bancroftiana com infecção ativa ou em endêmicos normais (CHANDRASHEKAR *et al.*, 1994).

Dissanayake *et al.*, (1994) sugerem que um antígeno recombinante originário de uma biblioteca de cDNA de MF de *B. malayi* parece só estar presente nos indivíduos verdadeiramente infectados com *W. bancrofti* ou *B. malayi*. Esse teste é capaz de distinguir indivíduos com infecção ativa daqueles com infecção passada ou indivíduos que foram simplesmente expostos às larvas infectantes, sem se tornarem infectados. Verificaram também que não existe correlação entre a carga parasitária e a positividade do teste, demonstrando que a resposta de anticorpos ao produto do gene *sxp-1* não é estágio específico e a sua positividade indica a presença de vermes adultos jovens ou maduros com ou sem microfilaremia.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Nos últimos anos, a biologia molecular, também, obteve avanços e trouxe uma contribuição impar, não apenas para o diagnóstico da filariose bancroftiana, como também de outras patologias. A utilização das ferramentas de biologia molecular nos estudos da filariose teve início a partir do ano de 1980, quando muitos pesquisadores deram ênfase e desenvolveu-se o procedimento de isolar e caracterizar seqüências de DNA filarial espécie-específicas. Um dos principais objetivos foi introduzir uma nova metodologia que

pudesse substituir a dissecação manual de milhares de mosquitos na avaliação do impacto dos programas de controle nas áreas endêmicas através da monitorização da infecção vetorial (ROCHA, 2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma metodologia que vem sendo padronizada e que tem se mostrado promissora, principalmente no tocante a análise dos exemplares de mosquitos (ROCHA, 2002). Como forma de diagnóstico, a PCR foi inicialmente utilizada para a análise de amostras de sangue coletadas em período noturno, mostrando-se satisfatória. No entanto, sua utilização em pacientes amicrofilarêmicos foi questionada, levando a necessidade de novos estudos. Em 2000, Dissanayake *et al.*, desenvolvendo estudos comparativos entre os métodos parasitológicos, Og4C3-ELISA, ultra-sonografia e PCR, constatou que a PCR não é capaz de detectar DNA em indivíduos amicrofilarêmicos, antígeno-positivo e nem em amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos (DREYER *et al.*, 2005). Na atualidade, além da necessidade de padronização adequada, perante as diversas formas clínicas, da disponibilidade dos *primers* das famílias repetitivas para os diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, o custo elevado é um dos fatores que distanciam a PCR de sua utilização na rotina laboratorial diagnóstica.

O desenvolvimento de análises enfocando o genoma filarial tem proporcionado um grande avanço no estudo do diagnóstico molecular da bancroftose como genes candidatos à produção de vacinas (RAGHAVAN *et al.*, 1991).

Em 2002, uma revisão realizada por Rocha *et al.* chamam atenção para as vantagens da utilização da ferramenta molecular no diagnóstico da bancroftose frente aos mais diversos fluidos biológicos. O desenvolvimento da pesquisa de DNA no diagnóstico molecular da filariose linfática, em amostras biológicas, tem aberto novas perspectivas no diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico da bancroftose, baseado em técnicas de biologia molecular, não está sendo ainda utilizado em larga escala, por não ter sido validado.

Alguns pesquisadores estão desenvolvendo e criando alternativas para o diagnóstico molecular da *W. bancrofti* com a modificação e aperfeiçoamento da técnica de PCR. Assim, Thanomsut *et al.* (2000) utilizaram a técnica de PCR-RFLP aplicada ao diagnóstico diferenciando espécies de filariais nos seres humano sendo um ensaio simples e de resultado preciso. Chansiri & Phantana (2002) realizaram um estudo onde a técnica de PCR foi muito sensível na habilidade de detectar a presença de 10 pg de DNA do parasito. A PCR pode detectar as larvas infectantes (L3) no mosquito *Culex quinquefasciatus*. Hassan *et al.* (2005) compararam a sensibilidade da técnica de PCR-ELISA em sangue noturno, onde obteve 100%, com as técnicas de filtração em membrana e de pesquisa de antígenos circulantes, identificando a capacidade da técnica em detectar as infecções filariais. Mishra *et al.* (2005) desenvolveram um método de PCR em uma única etapa onde foram realizadas a detecção combinada dos parasitos filariais humanos, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* mesmo em níveis baixos da infecção. Rao *et al.*, (2006) desenvolveram e avaliou ensaios com PCR em tempo real para detectar a *Wuchereria bancrofti* e também comparou a PCR em tempo real com a PCR convencional (C-PCR) para detectar o DNA de *W. bancrofti* em amostras de mosquitos coletadas em áreas endêmicas no Egito e em Papua Nova Guiné. Embora os dois métodos tivessem a sensibilidade comparável para detectar o DNA filarial em amostras de referência, a PCR em tempo real foi mais sensível do que C-PCR na prática com amostras do campo. Ou-

tras vantagens de PCR em tempo real incluem sua capacidade de elevada especificidade e risco diminuído da reação cruzada entre amostras do teste do DNA de *W. bancrofti* no sangue humano e nos mosquitos.

DIAGNÓSTICO POR IMAGEM

A ultra-sonografia foi primeiramente descrita, para pesquisa de *W. bancrofti*, em 1994, quando Amaral *et al.* em estudos desenvolvidos no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães evidenciaram vermes adultos em vasos linfáticos intraescrotais do cordão espermático. Este método permite detectar e monitorar vermes adultos vivos e dilatação linfática em pacientes com filariose bancroftiana. Quando desenvolvida de forma correta, essa técnica possibilita o diagnóstico precoce da infecção e contribui para um controle de cura mais eficiente, podendo medir diretamente a ação da droga sobre o parasito (SILVA *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

O diagnóstico laboratorial da filariose bancroftiana apresentou um significativo avanço ao longo de pouco mais de um século. Enfermidade que possuiu por muito tempo a gota espessa de sangue como exclusiva forma de detecção de parasitados, atualmente conta com inúmeras técnicas parasitológicas, imunológicas, moleculares e também de diagnóstico por imagem. O desenvolvimento destes métodos ampliou a sensibilidade de detecção dos indivíduos infectados pela *Wuchereria bancrofti*, auxiliando tanto no tratamento de pacientes assintomáticos, como na erradicação da doença. A técnica que se baseia na pesquisa de anticorpos anti-*Wuchereria bancrofti* (Bm14), bem como a análise molecular através da PCR, são bastante promissoras em inquéritos epidemiológicos, uma vez que padronizadas permitirão avaliar áreas endêmicas onde a população recebeu tratamento em massa e também no controle da infecção de vetores. Concluiu-se, ainda, que embora a técnica quantitativa de filtração em membrana de polycarbonato seja preconizada pela OMS como controle de cura, cada método deve ser utilizado em situações específicas e a associação de mais de uma técnica permite um diagnóstico mais preciso, conferindo assim uma maior fidedignidade ao resultado.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, F., DREYER, G., FIGUEREDO-SILVA, J., NORÕES, J., CAVALCANTE, A., SAMICO, S.C., SANTOS, A., COUTINHO, A. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.50, p.753-757, 1994.
- AMBROISE-THOMAS, P. Immunological diagnosis of human filariasis: present possibilities, difficulties and limitations. *Acta Tropica*, v. 31, p.108-128, 1974.
- BABU, B.V., NAYAK, N.A. Treatment costs and work time loss due to episodic adenolymphangitis in lymphatic filariasis patients in rural communities of Orissa, India. *Tropical Medicine and International Health*, v.8, p.1102-1109, 2003.
- BELL, D. Membrane filters and microfilarial surveys on day blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 61, p. 220-223, 1967.
- CHANDRASHEKAR, R., CURTIS, K.C., RAMZY, R.M., LIFTIS, F.L.B.W., WEIL, G.J. Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.64, p.261-271, 1994.
- CHANSIRI K, PHANTANA S. A polymerase chain reaction assay for the survey of bancroftian filariasis. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*. v.33, n.3, p.504-8, 2002.
- DISSANAYAKE, S., ROCHA, A., NORÕES, J., MEDEIROS, Z., DREYER, G., PIESSENS, W.F. Evaluation of PCR based methods for the diagnosis of infection in bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n.5, p.526-530, 2000.
- DISSANAYAKE, S., ZHENG, H., DREYER, G., XU, M., WATAWANA, L., CHENG, G., WANG, S., MORIN, P., DENG, B., KURNIAWAN, L., VICENT, A., PIESSENS, W. F. Evaluation of a recombinant parasite antigen for the diagnosis of lymphatic filariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 50, p.727-734, 1994.
- DREYER, G., ANDRADE, L., SANTO, M., MEDEIROS, Z., MOURA, I., TENÓRIO, J., ROCHA, A., CASSIMIRO, M.I., GALDINO, E., DREYER, E., BÉLIZ, M.F., RANGEL, A., COUTINHO, A. Avaliação do teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de filariose bancroftiana usando a microfilaria de *Wuchereria bancrofti* como antígeno, em Recife-PE, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, p.397-404, 1991.
- DREYER, G., MATTOS, D., NORÕES, J. Filariose Bancroftiana In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. José Rodrigues Coura (Ed). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005, 1ª Edição, pp 1087-1106.
- DREYER, G.; PIMENTEL, A.; MEDEIROS, Z.; BELIZ, F.; GALDINO, E.; MOURA, I.; COUTINHO, A.; ANDRADE, L.D.; ROCHA, A.; DA SILVA, L. M.; PIESSENS, W.F. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife, Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, v.1, p. 264-272, 1996.
- FONTES, G., BRAUN, B.F., NETO, H.F., VIEIRA, J.B.F., PADILHA, S.S., ROCHA, R.C., ROCHA, E.M.M. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.2, p.131-136, 2005.
- FONTES, G., ROCHA, E.M.M., BRITO, A.C., ANTUNES, C.M.F. Lymphatic Filariasis in Brazilian Urban Area (Maceió, Alagoas). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, n.6, p.705-710, 1998.
- FAIRLEY, N., H. Serologic and interdermal tests in filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, p.635-648, 1937.
- FRANKS, M.B. Specific soluble antigen in the blood of filarial patients. *Journal of Parasitology*, v.32, p.400-406, 1946.
- HASSAN, M., SANAD, M.M., EL-KARAMANY, I., ABDEL-TAWAB, M., SHALABY, M., EL-DAIROUTY, A., ASSAL, K., GAMAL-EDIN, M.K., ADEL EL-KADI, M. Detection of DNA of *W. bancrofti* in blood samples by QC-PCR-ELISA-based. *Journal Egyptian Society Parasitology*, v.35, n.3, p.963-70, 2005.
- HINRICHSSEN, S.L., MOURA, L., VIANA, H.S., FARIAS, F.O., MONTENEGRO, D. Filariose Bancroftiana In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Sylvia Lemos Hinrichsen (Ed). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005, 1ª Edição, pp 343-349.
- KNOTT, J. A. Method for making microfilarial surveys on day blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, p.191-196, 1939.
- LAMMIE, P.J., HIGHTOWER, A.W., EBERHARD, M.L. The age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.51, p.348-355, 1994.
- MEDEIROS, Z., OLIVEIRA, C., QUARESMA, J., BARBOSA, E., AGUIAR-SANTOS, A.M., BONFIM, C., ALMEIDA, J., LESSA, F. A filariose bancroftiana no município de Moreno – Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.1, p.73-79, 2004.
- MELROSE, W. D. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 947-960, 2002.
- MISHRA, K., RAJ, D.K., DASH, A.P., HAZRA, R.K. Combined detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* using single PCR. *Acta Tropica*, v.93, p.233-237, 2005.
- MORE, S.J., COPEMAN, D.B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Tropical Medicine and Parasitology*, v.41, p.403-406, 1990.
- RAGHAVAN N., McREYNOLDS, L.A., MAIANA, C.V., FEINSTONE, S.M., JAYARAMANE, K., OTTSEN, E.A., NUTMAN, T.B. A recombinant clone of *Wuchereria bancrofti* with DNA specificity for human filarial parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.47, p.63-72, 1991.
- RAMAIAH, K.D., DAS, P.K., MICHAEL, E., GUYATT, H. The economic burden of lymphatic filariasis in India. *Parasitology Today*, v.16, p.251-253, 2000.
- RAMZY, R., M. R., HELMY, H., FARIS, R., GAD, A. M., CHANDRASHEKAR, R., WEILL, G. J. Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 89, p.443-446, 1995.

- RAO, R.U., ATKINSON, L.J., RAMZY, R.M.R., HELMY, H., FARID, H.A., BOCKARIE, M.J., SUSAPU, M., LANEY, S.J., WILLIAMS, S.A., WEIL, G.J. A real-time PCR-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. v.74, n.5, p.826-832, 2006.
- ROCHA, A. Estudo imunológico da síndrome de eosinofilia pulmonar tropical causada pela filaria e outros helmintos. Rio de Janeiro, 1995. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. 138 p.
- ROCHA, A. Available laboratory diagnostic methods of lymphatic filariasis. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 32, p.265-270, 2000.
- ROCHA, A. Filariose Bancroftiana: Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da bancroftose. 2004. (Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Recife.
- ROCHA, A., ADDISS, D., RIBEIRO, M.E., NORÕES, J., BALIZA, M., MEDEIROS, Z., DREYER, G. Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. *Tropical Medicine and International Health*, v.1, p.859-864, 1996.
- ROCHA, A., JUNQUERIA AYRES, C., FURTADO, A. Molecular Approach in the diagnosis of lymphatic filariasis by *Wuchereria bancrofti*. *Revista de Patologia Tropical*, v.31, n.2, p.161-174, 2002.
- SILVA, E.C.B.F., FONTES, G., ROCHA, E.M.M. Avaliação da prevalência de Filariose linfática pela *Wuchereria bancrofti*, utilizando teste de imunocromatografia rápida ("ICT card test") em amostra da população das áreas endêmicas de Maceió-AL. 2004. (Monografia de Bacharelado em Farmácia), Universidade Federal de Alagoas, Alagoas.
- THANOMSUB, B.W., CHANSIRI, K., SARATAPHAN, N., PHANTANA, S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. *Molecular and Cellular Probes*, v.14, p.41-46, 2000.
- VOLLER, A., De SAVIGNY, D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *Journal of Immunology and Methods*, v. 46, p.1-29, 1981.
- WEIL, G.J., LAMMIE, P.J., WEISS, N. The ICT Filariasis Test: A Rapid-format Antigen Test for Diagnosis of Bancroftian Filariasis. *Parasitology today*, v.13, n.10, p.401-404, 1997.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION – Bridging the Gaps. World Health Report. Geneva. 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
 Fundação Oswaldo Cruz - Cidade Universitária
 CEP. 50670-420 – Recife – PE – Brasil.

Prevalência de risco cardiovascular em pacientes que fazem uso de terapia anti-retroviral*

Prevalence of cardiovascular risk in patients who make use of antiretroviral therapy

Áurea Regina Telles Pupulin¹, Dirceu Cassarotti², Larissa Mosko³, Mirian Hitomi Ando⁴, Miguel Spack Junior⁶, Sandra Vieira⁶ & Ciomar Aparecida Bersani Amado⁷

RESUMO - As manifestações cardiovasculares nos pacientes HIV são as mais diversas, conseqüentes da própria infecção pelo HIV, auto-imunidade, reação imunológica diante de outras infecções virais, inflamação crônica, neoplasias, imunossupressão prolongada, desnutrição e cardiotoxicidade dos medicamentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de risco cardiovascular em uma população HIV positiva de Maringá, Paraná, Brasil. Foram selecionados 60 pacientes por meio de amostragem sistemática. A avaliação clínica baseou-se em exame clínico geral com aferição de pressão arterial, pulso, frequência cardíaca, peso corporal, estatura, medida de cintura e quadril. O perfil laboratorial foi obtido por meio das dosagens de glicose sérica em jejum e lipidograma (Colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol, triglicérides). Utilizou-se a tabela de Escores de Framingham para cálculo do Risco de Doença Arterial Coronariana (DAC). Com relação aos fatores de risco aparece maior prevalência de história familiar em 80%, sedentarismo em 45% e tabagismo em 35%, dislipidemia em 36,6%. Nenhum paciente apresentou risco eminente de DAC, 34% risco > 20% em 10 anos, 25% risco < 20% e >5% em 10 anos, e 71,6% risco <5% em 10 anos. Apesar dos dados apontarem o risco relativo de doenças cardiovasculares, o risco absoluto permanece baixo para a maioria dos pacientes, tornando-se significativo naqueles com múltiplos outros fatores de risco cardiovascular.

PALAVRAS-CHAVE - risco cardiovascular, HIV, terapia anti-retroviral

SUMMARY - The cardiovascular manifestations in HIV patients are the widely diversified, consequent of the HIV infection itself, autoimmunity, immunological reaction ahead other viral infections, chronic inflammation, neoplasms, prolonged immunosuppression, malnutrition and the cardiotoxicity of medicines. This work had as objective to evaluate the prevalence of cardiovascular risk of a HIV positive population from Maringá, Paraná, Southern Brazil. There were selected 60 patients by systematic sample. The clinical evaluation were based in general clinical exam with arterial pressure gauging, pulse, cardiac frequency, body weight, stature, measure of waist and hip. The laboratorial profiles were obtained by dosages of seric glucose fasting, lipidogram (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides). It was used the table of Framingham Scores to calculate the Coronary Artery Disease (CAD) Risk. In relation to the risk factors, which appear with major prevalence are family history in 80%, sedentarism 45%, and tabagism 35%, dislipidemia 36,6%. No patients presented imminent risk of CAD, 34% presented risk > 20% in 10 years, 25% risk < 20% and >5% in 10 years, 71.6% presented risk <5% in 10 years. Although the data points a relative risk of cardiovascular diseases, the absolute risk remains low to the majority of the patients, becoming significant in those with multiple factors of cardiovascular risk.

KEYWORDS - cardiovascular risk, HIV, antiretroviral therapy.

INTRODUÇÃO

O acometimento cardíaco da infecção pelo HIV foi inicialmente descrito em 1983, por Autan e cols¹, que relataram um caso de sarcoma de Kaposi de miocárdio em um paciente com Aids. Desde então foram observadas especialmente em autópsias, prevalências de 28% a 73% de acometimento cardíaco nos pacientes HIV positivo, com envolvimento do pericárdio, endocárdio, miocárdio e dos vasos^{2,3}. As manifestações cardiovasculares são as mais diversas, conseqüentes da própria infecção pelo HIV, da auto-imunidade, reação imunológica diante de outras infecções virais, inflamação crônica, neoplasias, imunossupressão prolongada, desnutrição e cardiotoxicidade dos medicamentos^{4,5}. A introdução, em 1996, da terapia anti-retroviral de alta potência (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) possibilitou uma mudança na perspectiva e prognóstico da Aids como foi demonstrado em vários estudos, nos países com acesso a esta medicação⁶. Embora seja indiscutível o efeito positivo que a terapêutica HAART teve na qualidade de vida e redução de mortalidade relacionada com o HIV, novos problemas surgiram condicionados pelo próprio tratamento.

A terapia HAART está associada com um conjunto de riscos que incluem a lipodistrofia e a hipercolesterolemia. O aumento do colesterol e triglicérides confere um risco acrescido para o doente (AIDS Alert, 2002). A zidovudina tem sido associada em numerosos estudos à destruição difusa das

mitocôndrias cardíacas e inibição do DNA mitocondrial; isto levaria a acidose láctica que agrava mais a disfunção mitocondrial e conseqüentemente a disfunção do miócito^{7,8}. Há, ainda, relatos descrevendo a deficiência de selênio em músculo cardíaco de pacientes em estágios avançados da doença⁹ e uma excessiva produção de citocinas que podem causar alterações na função do miocárdio¹⁰. Este trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de risco cardiovascular em uma população HIV positiva de Maringá, Paraná, Brasil.

No Paraná, o primeiro caso de AIDS foi notificado em 1984. No município de Maringá têm 1.480 casos registrados até 2006, 925 masculino e 555 femininos (SINANW/SE/15^oRS).

METODOLOGIA

A população em estudo constituiu-se de pacientes portadores de HIV atendidos no Centro de Apoio-Maringá-Paraná. A casa de Apoio atende pacientes carentes da 15^a Regional de Saúde envolvendo 30 municípios da região Noroeste do Paraná que são encaminhados pela Regional de Saúde. Foram selecionados 60 pacientes por meio de amostra sistemática utilizando-se as fichas cadastrais dos pacientes em ordem alfabética, selecionou-se pacientes iniciando pelo número 3 e depois múltiplos de três até atingir-se a amostragem necessária. Após explicação do trabalho, assinavam o termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos.

Recebido em
Aprovado em

¹²³⁴Departamento de Análises Clínicas, a Professor Assistente Setor de Parasitologia, ²Médico Cardiologista, ³Acadêmico de Medicina, ⁴Farmacêutico-Bioquímico, ⁵Médico- Clínica Médica, ⁶Técnico de laboratório, ⁷Professor Adjunto Farmacologia Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

Foi realizada entrevista fechada abordando os itens: a) socioeconômico, coletando informações sobre idade, escolaridade, renda familiar, ocupação, mecanismo de infecção pelo HIV, b) histórico patológico, que coletou informações sobre infecção pelo HIV, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemias, cardiopatia e infecções oportunistas, c) histórico familiar, coletando informações sobre hipertensão, diabetes, dislipidemias, nefropatia, pneumonia, cardiopatia, anemia e doença psiquiátrica em parentes de primeiro, segundo e terceiro graus, d) hábitos de vida, constando os itens uso de tabaco, álcool, drogas ilícitas, prática de exercícios físicos, atividades de lazer, alimentação e e) medicamentos utilizados incluindo anti-retrovirais e outros.

A avaliação clínica do paciente baseou-se em exame clínico geral com aferição de pressão arterial, pulso, frequência cardíaca, peso corporal, estatura, medida de cintura e quadril. O perfil laboratorial foi obtido por meio das dosagens de: glicose sérica em jejum e lipidograma (Colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol, triglicérides).

Utilizou-se a tabela de Escores de Framingham para cálculo do Risco de Doença Arterial Coronariana (DAC).

RESULTADOS

Entre os pacientes estudados, 30 (50%) eram do sexo feminino e 30 (50%) masculino. A idade das mulheres variou entre 22 e 56 anos (média de 36 anos) e dos homens variou de 20 a 56 (média de 37 anos).

A renda mensal da maioria é proveniente de aposentadorias e trabalhos esporádicos; apenas 20% têm trabalho fixo. 58% ganham menos de um salário mínimo.

Em relação ao nível educacional 78,3% possuíam ensino fundamental, 18,3% ensino médio e 3% nunca frequentaram a escola. Desses a escolaridade mais baixa foi observada no sexo feminino.

Quanto ao mecanismo de infecção, 24 mulheres e 17 homens adquiriram o vírus através de contato heterossexual, 10 homens por meio de contato homossexual, enquanto duas mulheres e quatro homens relataram contaminação através de drogas injetáveis, duas mulheres tiveram contágio através de transfusão sanguínea e um homem não sabe como adquiriu a infecção. O tempo de infecção variou de um a 15 anos com média de 7 anos. Todos utilizam terapia anti-retroviral (TARV) com tempo de uso de um a 10 anos, média de cinco anos.

A tabela 1 mostra a prevalência de alguns fatores de risco de doença cardiovascular nos pacientes. Com maior prevalência aparece história familiar (cardiopatia, hipertensão, diabetes, dislipidemia) em 48 (80%), sedentarismo em 27 (45%) e tabagismo em 21 (35%), dislipidemia aparece em 22 (36,6%) dos pacientes. O uso de álcool corresponde a 26% dos pacientes e uso de drogas ilícitas 11%.

TABELA I

Prevalência de alguns fatores de risco cardiovascular em pacientes HIV. Maringá – Pr. 2005-2006 (n=60)

FATOR DE RISCO	n	%
Tabagismo	21	39,0
Hipertensão arterial	04	6,0
Diabetes mellitus	02	3,3
Dislipidemia	22	36,6
História familiar	48	80,0
Álcool	16	26,6
Uso de drogas ilícitas	07	11,6
Sedentarismo	27	45
Relação Cintura-Quadril acima do normal *(RCQ)	04	6,6

*RCQ – normal: F>0,8 e M>0,9

O risco de Doença Arterial Coronariana (DAC) é mostrado na tabela 2. Nenhum paciente apresentou risco eminente de DAC, dois pacientes (3,4%) apresentaram risco > 20% em 10 anos, 15 (25%) com risco < 20% e >5% em 10 anos, e 43 (71,6%) dos pacientes apresentaram risco, <5% em 10 anos.

TABELA II

Prevalência de alguns fatores de risco cardiovascular em pacientes HIV. Maringá – Pr. 2005-2006 (n=60) Risco de Doença Arterial Coronariana (DAC) segundo tabela de Escores de Framingham em pacientes HIV que utilizam terapia HAART – Maringá – Pr. 2005-2006 (n=60)

CATEGORIA DE RISCO	N.º	%
Presença de risco equivalente de DAC	00	0,0
Risco em 10 anos $\geq 20\%$	02	3,4
Risco em 10 anos $\leq 20\% \geq 5\%$	15	25,0
Risco < 5% em 10 anos	43	71,6

A tabela 3 mostra a ocorrência de fatores de risco correlacionando-as ao risco de DAC em 10 anos. Observa-se nesta tabela uma relação entre o número maior de fatores de risco associado a maior risco de DAC segundo escore de Framingham.

TABELA III

Ocorrência de fatores de risco cardiovascular e risco de doença arterial coronariana (DAC) segundo escore de Framingham em pacientes HIV. Maringá – Pr. 2005-2006 (n=60)

N.º de Fatores de risco - Risco de DAC em 10 anos		
	1% à 10%	11% à $\geq 53\%$
0 à 01	24	1
2 à 4	30	5
5 à 9	0	0

A tabela 4 mostra a prevalência de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia nesta população, ressaltando os valores de HDL-colesterol e LDL-colesterol.

TABELA IV

Ocorrência de fatores de risco cardiovascular e risco de doença arterial coronariana (DAC) segundo escore de Framingham em pacientes HIV. Maringá – Pr. 2005-2006 (n=60)

Colesterol Total (>200 mg/dl)		LDL Colesterol (160 mg/dl)		HDL Colesterol (≤ 60)		Triglicerídeos (>200 mg/dl)	
n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%
17	28	2	3	50	83	13	21

A maioria (68%) dos pacientes utiliza inibidores de proteases em esquemas combinados de terapia anti-retroviral.

DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a presença de risco cardiovascular para pacientes HIV utilizando como medida Tabela de Escores de Framingham. Foram avaliados pacientes com AIDS cadastrados na casa de Apoio, os quais eram todos pertencentes a grupos populacionais estigmatizados. Nenhum dos pacientes encontrava-se em internamento hospitalar durante o estudo consistindo em um grupo homogêneo. Mesmo antes da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) já se sabia que os pacientes infectados pelo HIV tinham alterações do metabolismo lipídico. A dislipidemia era mais comum entre aqueles com doença avançada¹¹. O padrão lipídico era de redução dos níveis de colesterol, incluindo os valores de HDL-colesterol e LDL-colesterol, mas com o aumento dos triglicérides^{12,13}. O achado de baixo

HDL-colesterol, com hipertrigliceridemia antes do início de terapia anti-retroviral parece ser diretamente relacionado à infecção pelo HIV¹⁴.

Por outro lado, a prevalência de dislipidemia em pacientes HIV positivos recebendo terapia anti-retroviral tem sido alvo de estudos. Fris-Moller e cols¹⁵, em um grande estudo transversal, registraram a presença de hipercolesterolemia em 27% dos pacientes recebendo esquema, incluindo inibidor de protease, 23% daqueles em uso de inibidor da transcriptidase-reversa nucleosídeo e em 10% dos que isoladamente usavam inibidor da transcriptidase-reversa não nucleosídeo, comparados com 8% dos previamente não tratados. Já para hipertrigliceridemia os percentuais correspondentes foram 40, 32 e 23% frente a 15% entre os previamente não-tratados.

Assim, de um modo geral, após o início da terapia anti-retroviral, há um aumento no colesterol total e no LDL-colesterol. Este aumento sugere a participação da terapia anti-retroviral. Quanto ao HDL-colesterol, geralmente permanece baixo, independente do início da terapia. Na amostra do presente estudo, houve elevação do colesterol total em 17 (28%) pacientes, HDL-colesterol em 50(83%) e do LDL-colesterol em dois (3%) pacientes sugerindo um efeito direto da infecção pelo HIV e não um efeito da terapia anti-retroviral. No caso dos triglicérides houve nesta população 13 (21%) pacientes com hipertrigliceridemia.

Embora o maior enfoque dado a Aids e alterações metabólicas sejam sobre efeitos colaterais da terapêutica anti-retroviral, trabalhos da era pré-HAART estabeleceram que a própria infecção pelo HIV determinasse um perfil lipídico mais desfavorável, caracteristicamente com hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol¹⁶. Constans e cols¹⁷ observaram inclusive implicação prognostica dessas alterações, quanto mais baixa a contagem de linfócitos T CD4, maior o nível de triglicérides e mais baixos os níveis de HDL-colesterol. A fisiopatologia desta associação não está esclarecida, compreendem-se mais as vias pelas quais a terapêutica anti-retroviral, especificamente os inibidores de protease, potencializa esse distúrbio lipídico e acarreta outros a ele associados, como o aumento da resistência insulínica, diabetes mellitus, lipodistrofia e obesidade centrípeta.

Carr e cols¹⁸ propuseram uma teoria baseada no achado de homologia estrutural entre o sítio catalítico da protease do HIV e proteínas humanas importantes no metabolismo lipídico (CRABP-1, proteína ligadora do ácido retinóico citoplasmático tipo I e LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL), de tal forma que os inibidores da protease inibiriam também etapas importantes do metabolismo humano. Em última instância os inibidores de protease determinariam uma interrupção na metabolização do ácido retinóico e menor atividade do PPAR- γ (*peroxidase proliferator activated receptor type gamma*), que tem papel fundamental na diferenciação dos adipócitos e na apoptose dessas células, o resultado final desses efeitos é uma maior liberação de gordura na corrente sanguínea e hipertrigliceridemia.

Chama atenção neste grupo a maior prevalência de fatores de risco. Embora se tenha aqui estudado uma amostra pequena neste levantamento as características de maior risco se assemelham aos da população da grande coorte de 23468 pacientes HIV do *The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs Study Group (DAD)*¹⁹. Comparando com os dados deste estudo, há semelhanças quanto a mediana de idade (39 anos no DAD versus 36 anos neste estudo), presença de diabetes (2,8% versus 3,3%), tabagismo (56,2% versus 39%), hipertensão arterial (7,2% versus 6%). Na amostra estudada, a presença de histórico famili-

ar, sedentarismo e drogas ilícitas também foram elevados comparados ao DAD.

Apesar de estes dados apontarem o risco relativo de doenças cardiovasculares, o risco absoluto permanece baixo para a maioria dos pacientes, tornando-se significativo naqueles com múltiplos outros fatores de risco cardiovascular. Com o passar do tempo, infecções oportunistas que eram causa de mortalidade para os pacientes HIV tem ganhado importância o sistema cardiovascular, uma vez que os pacientes vivem mais e sobre eles incide uma série de fatores de risco cardiovasculares e complicações metabólicas como é confirmado nesta população²⁰. Alguns aspectos abordados nos chamam atenção. Em primeiro lugar, a alta prevalência de tabagismo e os hábitos inadequados de vida e dieta desses pacientes que contribuem para o aumento de risco cardiovascular. E, não menos importante é a contribuição da adversidade dos anti-retrovirais que agem negativamente no metabolismo dos pacientes, além de promover interações medicamentosas consideráveis na presença de outros fármacos.

A avaliação do paciente HIV no contexto da doença cardiovascular exige alto grau de suspeição clínica, uma vez que o quadro clínico é frusto ou confundido com outras doenças mais comumente encontradas. O conhecimento das manifestações cardiovasculares do HIV aponta para a necessidade de implantação de medidas eficazes no intuito de deduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares neste grupo, o que pode ser conseguido por meio de um rígido controle dos fatores de risco, do diagnóstico precoce da cardiopatia, da instituição terapêutica adequada e, em última instância, da busca por um tratamento com menos efeitos adversos sem comprometer sua eficácia.

Os resultados do estudo do HOPS (HIV Outpatient Study) acompanhando 5.672 pacientes infectados com HIV-1, idade média de 42,6 anos para a incidência de enfarte do miocárdio durante o período de 10 anos, sugerem que o enfarte do miocárdio e, talvez, o angor poderiam surgir em pacientes que fazem uso dos inibidores de proteases durante alguns anos²¹. Os autores também verificaram que a maioria dos pacientes que tiveram um enfarte de miocárdio ou um episódio de angor também tinha outros fatores de risco adicionais, como o tabaco, a hipertensão, a hiperlipidemia e resistência de insulina associada com diabetes mellitus. Afirmam ainda estes autores que pacientes em uso de anti-retrovirais precisam ser seguidos durante muito tempo, para assim se verificar se o que os investigadores observaram continua.

Em conclusão, dadas às características do perfil de risco cardiovascular dessa população, as intervenções não farmacológicas devem ser aplicadas tendo o efeito importante de tratamento preventivo dos pacientes infectados pelo HIV. Os pacientes devem ser aconselhados a controlar os fatores de risco seguindo as orientações de estilo de vida, como parar de fumar, seguir dieta, realizar exercício físico, controlar hipertensão arterial e diabetes²².

REFERÊNCIAS

1. Autran BR, Gorin I, Leibowitch M. Aids in a Haitian woman with cardiac kaposi's sarcoma and Whipple's disease. *Lancet*, 1983;I 76-78.
2. D'Ámati G, Di Gioia CR, Gallo P. Pathological findings of HIV-associated cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 946, 23-45.
3. Barbaro G, Di Lorenzo G, Grisorio B. Cardiac involvement in the acquired immunodeficiency syndrome. A multicenter clinical-pathological study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, 14: 1071-7.
4. Arshad A, Bansal A, Patel RC. Cardiac complications of human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1998, 104: 107-11.

- ciency virus infection: diagnostic and therapeutic considerations. *Heart Disease*, 2000, 2, 133-45.
5. Barbaro G. Cardiovascular manifestations of HIV infection. *Circulation* 2002, 106, 1420-5.
 6. Palella F, Delaney KM, Moorman AC. Declining mortality among patients with advanced HIV infection. *NEJM* 1998;338(13):85
 7. Dalakas MC., Illa I, Pezeshkpour GH. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med* 1990, 332, 1098-1105.
 8. Lewis W, Papoian T, Gonzales B. Mitochondrial ultrastructural and molecular changes induced by zidovudine in rat hearts. *Lab Invest* 1991;65:228-236.
 9. Zazzo JF, Chalas J, lafont A. Is nonobstructive cardiomyopathy in AIDS a selenium deficiency-related disease. *J Parenter Enteral Nutr* 1988, 12:537-538.
 10. Yamamoto N. The role of cytosines in the acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Clin lab Res* 1995, 25: 29-34.
 11. Grunfeld C, Kotler DP, Hamadeh R. Hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J med* 1989, 86:27-31.
 12. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, 74:1045-1052.
 13. Shor-Posner G, Basit A, Lu Y. Hypcholesterolemia is associated with immune dysfunction in early human immunodeficiency virus-1 infection. *Am J Méd* 1993;94:515-19.
 14. Dube MP, Stein JH, Aberg JA. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV) infected adults receiving anti-retroviral therapy: recommendations of the HIV medical Association of the Infectious Disease Society of América and the Adult AIDS Clinical Trial Group. *Clin Infect Dis.* 2003, 37:613-27.
 - 15., Webwe R, Reiss P. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients- association with anti-retroviral therapy: results from the DAD study. *AIDS* 2003, 17:1179-93.
 16. Sposito A, Caramelli B, Sartori AM, Ramires JAF. The Lipoprotein Profile in HIV Infected patients. *Braz J Infect Dis* 1997; 275-83.
 17. Constans j, pellegrin JL, peuchant E. Plasma lipids in HIV-infected patients; a prospective study in 95 patients. *Eur j Clin Invest* 1994, 24;416-20.
 18. Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper D. Pathogenesis of HIV 1 protease inhibitor-associated peripheral lipodistrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance. *The lancet* 1998, 351;1881-83.
 19. The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination anti-retroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med. J Méd.* 2004;350:955.
 20. Law MG, D'Ármino Monforte A, Friis-Moller N. cardio and cerebrovascular events and predicted rates of myocardial infarction in the DAD study proceedings of the 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2004 Febr 8-11, San Francisco (USA). Program and Abstracts;737.
 21. Dube MP, Stein Jh, Aberg J. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus infected adults receiving antiretroviral therapy. *Clin Infec Dis* 2003, 37:613-27.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
 AV. COLOMBO 5790 BLOCO I-90 SALA 11 Maringá PR
 E-MAIL: artpupulin@uem.br

Vacina de DNA contra doenças infecciosas

DNA vaccines against infectious diseases

Juliana Costa Curta^{1*}; Rita de Cássia Garcia Simão¹ & Juliana Seger²

RESUMO - A imunização ativa é um importante aliado da medicina moderna para o controle de doenças infecciosas. Muitas doenças infecciosas já foram controladas ou mesmo erradicadas através do uso de vacinas. No entanto muitas ainda permanecem resistentes às tentativas de controle. O desenvolvimento recente da Imunologia e da Biologia Molecular permitiu o desenvolvimento da vacina de DNA, a qual apresenta seqüências do material genético do agente infeccioso que codificam antígenos imunodominantes. Ao contrário das vacinas tradicionais, as vacinas de DNA têm a capacidade de gerar resposta celular e humoral. Discutiremos nesse artigo as vacinas de DNA que estão sendo desenvolvidas para algumas doenças infecciosas causadas por vírus, bactéria e parasitas e também algumas considerações sobre segurança para uso destas vacinas nos seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE - Vacina, infecção, imunidade, vírus, bactéria, parasita.

SUMMARY - Active immunization is an important ally of modern medicine for the control of infectious diseases. Many infectious diseases have already been either controlled or eradicated through the use of vaccines. However, there are many that remain resistant to attempts at controlling them. The recent progress in Molecular Immunology and Biology have led to the development of the DNA vaccination. It presents sequences of genetic material of the infected agent which codifies immuno-dominant antigens. Differently from traditional vaccines, DNA vaccines are able to generate humoral and cellular responses. In this article, I discuss DNA vaccines which are being developed against certain infectious diseases caused by virus, bacteria and parasites. I also consider safety aspects with regard to the use of these vaccines in human beings.

KEYWORDS - Vaccine, infection, immunity, virus, bacteria, parasites.

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas podem ser caracterizadas como processos agudos e de alta letalidade e como processos crônicos, capazes de subsistir durante a maior parte da vida do portador, aparentemente sem produzir maiores prejuízos. Essas doenças constituem um grupo muito heterogêneo e posuem em comum apenas o fato de serem ocasionadas por parasitas: agentes etiológicos vivos, adquiridos em algum momento pelos hospedeiros a partir do meio ambiente externo²⁶. Um importante aliado da medicina moderna no controle de doenças infecciosas é a imunização ativa através do uso de vacinas. Vacinas estas que podem ter diferentes processos de produção e mecanismos de ação. Entre as técnicas mais conhecidas e utilizadas para produção de vacinas destacam-se as produzidas com vírus atenuados através da passagem múltipla em cultura de tecidos, inativação de patógenos através de processos químicos ou físicos e ainda as baseada na tecnologia de antígeno de superfície recombinante²⁸. Diversas doenças foram controladas, ou mesmo erradicadas, graças à introdução destas vacinas. É notória a erradicação da varíola, além do relativo controle de sarampo, hepatite e coqueluche. No entanto, muitas infecções permanecem resistentes à tentativas de controle pela imunização, tais como o herpes simples, tuberculoses, HIV, malária entre outras^{28,31}. O desenvolvimento recente da Imunologia e da Biologia Molecular permitiu o desenvolvimento da vacina de DNA. Ao contrario das vacinas precedentes, onde muitas foram projetas para induzir a produção de anticorpos com mecanismo de proteção contra doenças clínicas causadas por microorganismos, as vacinas de DNA são projetas para gerar resposta imune celular e humoral. As doenças alveja-das expandiram das doenças infecciosas para incluir câncer, alergias e doenças autoimunes^{31,18}. Nós discutiremos conseqüências da Vacina de DNA para algumas doenças infecciosas que têm impacto grande na saúde humana e/ou onde a resposta de células T citotóxicas tem um papel de proteção imune induzido pela vacina.

VACINA DE DNA

A vacina de DNA baseia-se no uso de seqüências do material genético do agente infeccioso que codificam antígenos imunodominantes. Estas seqüências são inseridas em vetores (plasmídeos ou vetores virais). Quando administrados ao indivíduo, esse DNA permite a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado e é capaz de induzir resposta imune específica celular e humoral com memória. Além disso, as vacinas de DNA mimetizam os efeitos das vacinas vivas por possibilitarem a geração de antígenos endógenos, e conseqüentemente, a ativação dos linfócitos T CD8+, e também atuam como adjuvantes da resposta celular devido à presença de seqüências CpG, que são seqüências específicas de DNA imunoestimulatórias^{31,11}. O tipo de resposta imune que ocorre após a vacinação depende da via de administração. Quando o DNA é inoculado por via intramuscular desenvolve-se uma resposta celular com produção de citocinas de padrão Th1, enquanto que a administração da vacina via intradérmica leva a uma resposta humoral do tipo Th2¹¹. A estrutura da vacina de DNA inclui a clonagem genes ou fragmentos de genes relacionados à virulência ou patogenicidade de um microorganismo em um plasmídeo, também chamado de vetor. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria geralmente *Escherichia coli*, por transformação bacteriana. A bactéria ao se replicar, permite que o plasmídeo se reproduza em larga escala, o que é fundamental para a produção da vacina⁶. O vetor deve possuir seqüência promotora ativa em mamíferos, seqüência sinal para finalização da transcrição, gene de resistência a antibiótico (que permite selecionar as bactérias que foram transformadas pela inserção do plasmídeo), origem de replicação e estabilidade da seqüência de mRNA. Normalmente os plasmídeos também possuem seqüências de nucleotídeos, "motifs" CpG (citocina-fostato-guanina não metiladas), as quais têm sido responsabilizadas pelo aumento da imunogenicidade deste tipo de vacina, pois estimulam a produção de citocinas^{31,18,11}. Também

Recebido em
Aprovado em

^{1*}Farmacêutica e Bioquímica aluna do curso de Pós-Graduação lato sensu em Análises Clínicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

¹Professora do curso de Pós-Graduação lato sensu em Análises Clínicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

²Coordenadora do curso de Biomedicina Universidade do Oeste de Santa Catarina, Brasil.

podem ser inseridos outros genes além daqueles que codificam o antígeno, como genes para síntese de citocinas ou expressão de moléculas co-estimulatórias, com o objetivo de melhorar a eficácia da vacina⁶.

A entrada do plasmídeo nas células é denominada transfecção. Os métodos mais comuns para tanto são a transfecção *in vitro* de células somáticas e reimplantação dessas células no indivíduo, utilizando vírus ou bactérias modificadas (não virulentas, incapazes de replicação) contendo o gene de interesse, capazes de inserir o material na célula e injeção com o próprio plasmídeo, chamado de DNA nu¹¹. Uma vez dentro do citoplasma, o DNA se desloca até o núcleo, onde o gene de interesse é transcrito, produzindo o mRNA, que migra para o citoplasma, onde ocorre a síntese da proteína, que, no caso, é um antígeno. Como a vacina gênica geralmente é administrada via intramuscular, o miócito é a primeira célula que entra em contato com o material genético fornecido. Por não possuir moléculas co-estimulatórias, apesar de conseguir apresentar o antígeno processado, não é capaz de ativar linfócitos T. Assim, o que se propõe é que essa célula, após codificar o antígeno, libera-o no meio extracelular, onde uma célula apresentadora de antígeno (APC) o fagocita e apresenta com MHC de classe II. Este mecanismo é chamado de "cross-priming". Há outras hipóteses, menos aceitas, de que a própria APC sintetiza e apresenta o antígeno ou de que a célula muscular o faz^{18,11}.

VACINA DE DNA CONTRA INFECÇÕES VIRAIS

As vacinas de DNA inicialmente foram direcionadas contra as viroses. Os vírus são entidades geneticamente simples, muitos de seus antígenos são molecularmente definidos e os mecanismos de proteção imune estão na maior parte compreendidos. Em modelos experimentais a proteção contra infecções viral é mais comumente medida por anticorpos neutralizantes e em alguns casos por células T citotóxicas, dois mecanismos imunes efetores que são induzidos pela vacinação com DNA²⁸.

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA – HIV

A busca por uma vacina eficaz para controlar a pandemia do HIV começou com a descoberta do vírus a mais de 20 anos atrás. As tentativas para desenvolver uma vacina segura e eficaz foram retardadas, em parte, pela dificuldade em definir as respostas imunes específicas que podem prevenir a infecção e limitar a progressão da doença. A estrutura e o ciclo de vida complexo, assim como a elevada taxa de mutação do HIV-1 forneceram obstáculos adicionais ao desenvolvimento de vacinas⁹.

O desenvolvimento de vacinas tradicionais como o uso de vírus vivo atenuado ou inativado não se mostraram eficazes ou viáveis com relação ao HIV, como também o uso de partes do vírus por recombinação ou por inativação e fracionamento não obtiveram sucesso até o momento⁷.

As vacinas subunitárias avaliadas incluem os genes e proteínas estruturais (*gag*, *env*, *gp120*, *gp41* e *gp160*), enzimas virais (*pol*) e proteínas reguladoras (*nef*, *tat*, *ver* e *vpr*) que apresentaram uma capacidade de induzir resposta imune celular e humoral em níveis variados, mas os resultados foram desanimadores, ainda que tenham conseguido estimular a formação de anticorpo neutralizante. Vacinas de vetores recombinantes conseguiram estimular a imunidade humoral e celular e tem se mostrado uma estratégia promissora¹⁷. No entanto a estratégia mais promissora para o desenvolvimento de vacinas contra HIV, são as vacinas de DNA, na qual vários genes tem sido testados como *gag*,

pol, *env*, *tat*, *ver* e *nef*. Os estudos mostraram uma capacidade para induzir resposta imune celular e humoral em ratos e macacos, mas os estudos destas vacinas ainda estão em etapas iniciais dos ensaios clínicos^{7,9}.

O estudo clínico para profilaxia e terapia imune usando a vacina de DNA contra HIV parecem ser bem tolerado nos seres humanos, até agora nenhum estudo apresentou efeitos adversos significativos. No entanto essas vacinas são imunogênicas nos seres humanos em grau variado. Na situação de terapia, algumas evidências mostraram um aumento da imunidade celular, contudo, os efeitos relativos à carga viral ainda estão esperando confirmação. Em experiência de profilaxia, as respostas de anticorpos foram muito baixas ou inexistentes. As respostas de linfócito T CD4+ foram observadas com frequência razoável, mas as respostas de linfócitos T CD8+ não foram fortes o suficiente para o controle eficaz da infecção^{9,8}.

As diferentes vacinas avaliadas até hoje apresentaram dificuldade em induzir imunidade humoral e celular protetora contra o HIV, por isso tem-se optado por uma estratégia alternativa de combinar vacinas, onde uma tem a capacidade de induzir imunidade celular, de memória, e a outra de induzir a formação de anticorpos. A combinação de vacina de DNA com vacina subunitárias ou de vetor recombinante é uma das estratégias sob avaliação⁷.

HEPATITE B E C

A vacina recombinante atual da proteína de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é eficaz, mas demasiadamente cara para imunização em massa. Além disso, alguns pacientes não desenvolvem anticorpos detectáveis de Anti-HBs, apesar das injeções múltiplas da vacina. A proteína recombinante que confere imunidade através de um anticorpo é incapaz de produzir uma resposta através de células T CD8+ necessárias para combater o HBV de pacientes com hepatite crônica²⁸.

A imunização de animais com vetores de plasmídeo de DNA que codificam proteínas pequenas e médias do envelope, induzem resposta imune humoral e celular mais forte e mais longa, do que a imunização com partículas pequenas e médias de proteínas recombinantes do envelope que são usadas nas vacinas convencionais. Além disso, a imunização mediada pelo DNA mostrou diminuir a tolerância imune em ratos infectados com HBV, indicando que as vacinas de DNA podem também ser benéficas para imunoterapia das infecções crônicas do HBV.

As vacinas de DNA podem induzir as respostas de linfócitos T citotóxico, mas quando comparado com as vacinas convencionais as vacinas de DNA são frequentemente menos potentes na indução de resposta de anticorpo^{12,32}.

Pacientes com Vírus da Hepatite C (HCV) estão predispostos a doenças crônicas do fígado e ao carcinoma hepatocelular por falta de uma terapia antiviral eficaz. As vacinas profiláticas e terapêuticas são, portanto, necessárias para o combate HCV. Embora as respostas por anticorpos sejam induzidas durante a infecção, as células T helper do tipo Th1 e linfócitos T citotóxicos são de extrema importância para combater o HCV, tornando a vacina de DNA é uma alternativa promissora para tratamento terapêutico da hepatite C³². O genoma do HCV apresenta uma elevada taxa de mutação, o que explica a existência de vários genótipos, subtipos e espécies. As principais vacinas de DNA que estão sendo desenvolvidas contra HCV utilizam plasmídeos que codificam proteínas do envelope do vírus como a E1 e a E2. Os resultados obtidos com essas proteínas mostram

uma resposta humoral e celular específica em ratos. A resposta imune celular obtida foi tipo Th1 que tem a capacidade de ativar linfócitos T citotóxicos que são importantes no combate da doença³⁴.

VÍRUS DO HERPES SIMPLEX (HSV)

O HSV apresenta duas cepas distintas, o HSV-1 e o HSV-2 responsáveis pelos quadros extragenitais e perigenitais, respectivamente, do herpes simples. Embora seja uma infecção de curso rápido, esse agente esta freqüentemente relacionado a complicações no tratamento de pacientes imunocomprometidos como indivíduos transplantados, na condição de agente oportunista²².

As primeiras tentativas de vacinas anti-herpéticas utilizavam o vírus morto ou atenuado, após sucessivas passagens em culturas de células. Seguiram-se as vacinas que usavam as glicoproteínas de superfície do HSV que apresentavam potencial imunogênico e grande especificidade biológica. Um problema especial no desenvolvimento de vacinas específicas, esta no fato do vírus HSV permanecer latente no tecido nervoso, que tem mínima capacidade de expressão antigênica^{23,28}.

As vacinas gênicas ou de DNA, ainda em fase de padronização, vêm-se tornando extremamente úteis no combate à infecção pelo HSV. A vacina DISC ("disabled infectious singles cycle") foi desenvolvida com partículas infectivas incapazes para mais de um ciclo replicativo, mas capaz de induzir resposta imunológica celular e humoral exatamente como o vírus selvagem sem os riscos incluídos neste último. Animais vacinados com HSV-1 DISC mostraram proteção estatisticamente significativa contra primoinfecção herpética e quadros recorrentes. Resultados semelhantes foram observados nos modelos animais utilizando HSV-2 DISC com redução de 98,6% na doença recorrente²³.

VACINA DE DNA CONTRA INFECÇÕES BACTERIANAS

O aumento no numero de patógenos bacterianos que apresentam resistência a antibióticos renovam a necessidade do desenvolvimento de vacina anti-bacterianas. As bactérias que têm replicação extracelular são combatidas melhor pela resposta imune humoral enquanto que bactérias intracelulares facultativas são melhor combatidas pela resposta imune celular. Entre as vacinas de DNA contra bactérias que estão sendo testadas estão as vacinas contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium tetani*, *Chlamydia trachomatis* e *Salmonella Typhi*²⁸.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A tuberculose é uma doença infecciosa que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*. É responsável por cerca de 2 a 3 milhões de mortes por ano e permanece como a segunda maior causa de morte por doença infecciosa no mundo. A associação com vírus HIV e a situação de extrema pobreza de alguns países em desenvolvimento são condições que propiciam o aumento desses índices. Além disso, a resistência múltipla a drogas e a imunogenicidade baixa da vacina Bacilli Calmette-Guérain (BCG) mostram a necessidade urgente de uma vacina eficaz²⁹. A vacina gênica para tuberculose baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65kDa (HSP65) de *Mycobacterium leprae* é uma das mais estudadas. A HSP65 micobacteriana é um antígeno imunodominante, pois camundongos imunizados com *M. tuberculosis* apresentam 10

a 20% de células específicas para a HSP65 entre todas as células responsivas ao bacilo. Diante disso, essa proteína encontra-se entre os antígenos potenciais para o desenvolvimento de vacinas contra tuberculose. Entretanto, a administração da proteína acrescida de adjuvantes não se mostrou eficiente para vacinação, por isso o gene que codifica a HSP65 foi clonado em vetores (pCDNA3 e pHMG) para a avaliação da resposta protetora. Utilizando-se camundongos BALB/c imunizados por via intramuscular foram observadas a presença de células produtoras de altos níveis de interferon-gama, se comparado a produção de interleucina-4, indicando uma estimulação preferencial de células tipo Th1^{14,29}. Observou-se também a produção de anticorpos específicos anti-HSP65 recombinante; intensa resposta linfoproliferativa de células do baço estimuladas com HSP65 recombinante, aumento na frequência de células, HSP65 reativas nos linfonodos e produção de células de memória. A imunização intramuscular com DNA-*hsp65* protegeu camundongos contra posterior infecção com *M. tuberculosis*^{14,21}. Outros estudos mostram que vacina de DNA que codificam o antígeno 85 (Ag 85) pode diminuir significativamente as cargas bacterianas pulmonar e esplênica, além de reduzir as lesões pulmonares em ratos infectos com cepas *M. tuberculosis* virulenta^{14,29}.

M. bovis, *M. leprei*, *M. avium* e *M. ulcerans* estão entre as micobactérias que estão sendo estudadas para desenvolvimento de vacinas gênicas¹⁴.

CHLAMYDIA TRACHOMATIS

A *Chlamydia trachomatis* é o agente causador de doenças do trato urogenital, linfogranuloma venéreo, tracoma, conjuntivite de inclusão e pneumonia no recém-nascido. O maior impacto da infecção por clamídia ocorre no sistema reprodutivo das mulheres. A recorrência das infecções é comum, especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos, e a imunidade desenvolvida é parcialmente protetora. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de se desenvolver seqüelas e a chance de se contrair a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana^{13,20}.

O antígeno predominante usado em pesquisa da vacina de DNA contra *C. Trachomatis* é o antígeno que corresponde a uma proteína de membrana externa denominada MOMP ("major outer membrane protein") codificado pelo gene *ompA*. A MOMP induz resposta protetora através de resposta imune humoral e celular. Além disso, os anticorpos monoclonais anti-MOMP oferecem a capacidade para neutralizar a infectabilidade da bactéria. A fim de estimular as respostas imune geradas pela vacina de DNA com o plasmídeo que codifica MOMP foi utilizado um complexo imune-estimulante de MOMP (ISCOM) em ratos, obtendo-se deste modo uma resposta imune mais forte. Isso foi correlacionado com uma redução significada do número inclusões bacterianas nos pulmões de ratos. Infelizmente, o efeito protetor desse tipo de vacinação não foi observado nos modelos de infecção genital^{5,13}.

Os outros antígenos testados em experimentações da vacina de DNA contra *C. trachomatis* incluem a citocinas trifosfato (CTP) sintetase e o antígeno *pgp3*. Embora a imunização com DNA para gene de CTP sintetase induz uma resposta humoral significativa, não induz nenhuma proteção. A vacinação com DNA para o gene *pgp3* induz resposta humoral e celular, os anticorpos são parcialmente protetores contra a infecção genital^{4,20}.

Além dos estudos para *C. trachomatis* outras espécies pertencem à família das *Chlamydiaceae* estão sendo estudadas para produção de vacina de DNA como *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus* e *C. muridarum*¹³.

VACINA DE DNA CONTRA INFECÇÕES PARASITÁRIAS

A aplicação da tecnologia da vacina de DNA no que diz respeito a infecções parasitárias fornece uma nova esperança para avanços significativos na pesquisa vacinal anti-parasitária. Uma consideração importante para vacinas contra parasitas é a complexidade das doenças parasitárias. As infecções por parasitas, ao contrário das infecções virais e bacterianas, tendem a ser crônicas e associadas à imunodepressão ou respostas imune impróprias³. Os parasitas têm ciclos de vida complexos e a imunidade do hospedeiro aos antígenos estágio-específicos não podem sobrepor-se com a de estágio da infecção. A variação antigênica e outros mecanismos imunes de evasão complicam também o desenvolvimento das vacinas contra parasitas. Entretanto, com a tecnologia de DNA recombinante e a versatilidade da vacina de DNA, é possível agora pensar em estratégias específicas para desenvolvimento de vacina contra doenças parasitárias como no caso de doenças causadas por *Plasmodium* sp, *Schistosoma* sp e *Leishmania* entre outros^{15,30}.

PLASMODIUM SP.

O parasita protozoário do gênero *Plasmodium* é o agente causador da malária, a doença vetor-carregado mais prevalente. O desenvolvimento de uma vacina é complicado pelas mudanças morfológicas do parasita durante seus diferentes estágios de vida. Além disso, suas proteínas de superfície são imuno evasivas reservando antigenicidade variável¹⁵. Estudos indicam que uma vacina preventiva seria praticável e poderia ser alvejada em qualquer estágio do ciclo de vida do parasita para impedir a replicação e consequentemente a diminuição da carga parasitária. Uma vacina seria visada ideal no estágio de pré-eritrócito ou quando a infecção se manifesta no fígado na forma de esporozóita, porque esta impediria a disseminação da infecção e as manifestações clínicas da malária²⁸.

Vários antígenos estão sendo testados em animais para desenvolvimento de uma vacina de DNA contra malária, entre os antígenos estudados estão, a proteína circunsporozóita do *P. berghei* e do *P. yoelli* que apresentaram resposta imune através da indução de células T CD8+^{25,30}, a proteína de superfície do *P. falciparum* que quando usada via intramuscular apresentam significativo aumento da resposta de anticorpos¹⁶, a proteína obrigatória do eritrócito do *P. falciparum* que elevou os níveis de anticorpos além da habilidade para reduzir a parasitemia², e a proteína circunsporozóita do *P. falciparum* que apresenta uma resposta Th1 específica através de células CD4+ e CD8+³³.

SCHISTOSOMA SP.

Parasita da classe trematoda que tem prevalência em países subtropicais e tropicais. O plasmídeo de DNA que codifica o antígeno tegumentar do esporocisto da forma adulta do *S. mansoni*, a peroxidase glutatona, o superóxido dismutase citosólica e o peptídeo sinal que contém a superóxido dismutase foram testados em ratos, e apresentaram uma redução da carga parasitária, indicando que a vacinação do DNA pode fornecer algum grau de proteção contra esse agente infeccioso^{15,28}.

LEISHMANIA SP.

As leishmanioses como a malária e a schistosomose tem uma incidência elevada em países em desenvolvimento, sendo a forma visceral e kalazar progressivas e fatais. Os

animais imunizados com vacina de DNA para a principal glicoproteínas de superfície (LACK) apresentaram uma proteção imune mediada por células do tipo Th1 e uma redução das lesões causadas pela doença¹⁵.

CONSIDERAÇÕES DE SEGURANÇA PARA USO DE VACINA DE DNA NOS SERES HUMANOS

Vacinas são administradas a pessoas sadias e, por isso, devem ter um alto padrão de biossegurança. Os testes clínicos das vacinas de DNA são similares aos outros produtos biológicos, sendo o seu controle de qualidade mais fácil e menos oneroso, pois, necessita apenas da certificação da pureza do DNA. Contudo alguns pontos devem ser considerados para a produção de uma vacina de DNA³¹. A integração do DNA do plasmídeo com o genoma de um animal vivo, se ocorrer, pode não ter nenhum efeito biológico. No entanto, tal integração pode ter potencial mutagênico, se o evento da integração causar a ruptura de um gene celular. Em uma situação mais extrema, a integração pode ser carcinogênica, se o evento da integração inativar um gene regulatório do ciclo da célula ou ativar um oncogene^{10,24}. Para tentar diminuir a possibilidade desse evento ocorrer, deve-se evitar, se possível, há existência de seqüências nucleotídicas homólogas ao genoma humano no plasmídeo vacinal e que este não se replique nas células hospedeiras¹⁰.

As reações auto-imunes podem ser induzidas se a resposta imune ao antígeno codificado resultar na destruição imune das células do hospedeiro que expressam os genes do antígeno. Existe também a possibilidade de indução de tolerância imunológica antígeno específica^{1,10}.

A indução de resposta imune patogênica inicialmente dirigida contra o DNA do plasmídeo também deve ser considerada no uso da vacina de DNA. Embora os anticorpos anti-DNA patogênicos sejam acreditados geralmente para ser a principal causa do lúpus eritematoso sistêmico (LES), muitos outros fatores tais como a susceptibilidade genética e disfunção imune subjacente têm papel nessa doença. Não está esclarecido ainda se a exposição ao DNA bacteriano pode induzir ou exacerbar o LES nos seres humanos. Embora a probabilidade da indução anticorpo anti-DNA patogênica pela vacinação com DNA de plasmídeo necessite ser considerada com cuidado, os estudos em animais de laboratório mostraram que DNA purificado não induz prontamente os anticorpos anti-DNA^{10,27}.

CONCLUSÃO

As vacinas de DNA têm dado uma contribuição real no campo da vacinologia e possuem uma grande vantagem em relação às vacinas tradicionais, o que torna essa tecnologia um instrumento importante no combate às doenças infecciosas que afetam a nossa sociedade²⁸.

Comparado com outros tipos de tecnologia para produção de vacinas, as vacinas de DNA têm um grande potencial de aplicação. Uma vez que a produção e o processo de purificação para o plasmídeo de DNA foram estabelecidos, um processo similar pode ser aplicado a uma vacina diferente de DNA, desde que somente o gene introduzido seja diferente⁶. Sendo diferente portanto, de vacinas atenuadas, inativadas ou de proteínas recombinantes onde cada uma requer um processo de produção e purificação original. Em adição, o plasmídeo de DNA é relativamente mais estável que as outras vacinas existentes, significando que as vacinas de DNA podem ser mais apropriadas para vacinação em massa. Assim, as vacinas de DNA podem ser consideradas uma nova plataforma para vacinas futuras, uma vez que podem gerar resposta imune celular e humoral³¹.

REFERÊNCIAS

1. BABIUK, L. A. et al. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, v. 21, p. 649-658, 2003.
2. CAMPBELL K.; DIAO H.; JI J., SOONG L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 6270-6278, 2003.
3. COX F.E. Designer vaccines for parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.*, v. 27, p. 1147-1157, 1997.
4. DONATI M. et al. DNA immunization with pgp3 gene of *Chlamydia trachomatis* inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3H/HeN mice. *Vaccine*, v. 21, n. 7, p. 1089-1093, mar. 2003.
5. DONG-JI Z. et al. Priming with *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhances protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th1 cellular immune responses. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 6, p. 3074-3078, jun. 2000.
6. DONNELLY J. J.; ULMER J. B. DNA vaccines for viral diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 315-222, 1999.
7. EXCLER J. L. AIDS vaccine development: Perspectives, challenges e hopes. *Indian J. Med. Res.*, v. 121, p. 568-581, apr. 2005.
8. GIRARD M. P.; OSMANOV S. K.; KIENY M. P. A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine*, v. 8, n. 24, p. 4062-81, may 2006.
9. GIRI M. et al. DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade. *Clinical microbiology Reviews*, v. 17, n. 2, p. 370-389, apr. 2004.
10. GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, v. 4, n. 26, 2005.
11. GURUNATHAN S.; KLINMAN D. M.; SEDER R. A. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Review of Immunology*. v. 18, p. 927-974, apr. 2000.
12. HE X. et al. Induction of mucosal and systemic immune response by single-dose oral immunization with biodegradable microparticles containing DNA encoding HBsAg. *Journal of General Virology*. v. 86, p. 601-610, 2005.
13. HECHARD C.; GREPINET O. DNA vaccination against Chlamydiaceae: current status and perspectives. *Vet. Res.*, v. 35, n. 2, p. 149-161, mar/abr. 2004.
14. HUYGEN K. On the Use of DNA vaccines for the Prophylaxis of Mycobacterial Diseases. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 1613-1621, apr. 2003.
15. IVORY C.; CHADEE K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy*, v. 2, n. 17, dec. 2004.
16. KUMAR S. et al. A DNA vaccine encoding the 42 kDa C-terminus of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* induces antibody, interferon-gamma and cytotoxic T cell responses in rhesus monkeys: immunostimulatory effects of granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Immunol. Lett.*, v. 81, p. 13-24, 2002.
17. LETVIN N. L. Strategies for an HIV vaccines. *The J. Clin. Invest.*, v. 110, n. 1, p. 15-20, jul. 2002.
18. LIU M. A. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, v. 253, p. 402-410, 2003.
19. LONGBOTTOM D. Chlamydial vaccine development. *J. Med. Microbiol.*, v. 52, n. 7, p. 537-540, jul. 2003.
20. LONGBOTTOM D.; LIVINGSTONE M. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. Jour.*, v. 171, n. 2, p. 263-275, mar. 2006.
21. LOWRIE D. B. et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, v. 400, p. 269-271, jul. 1999.
22. LUPI O. Herpes simplex. *An. Bras. dermatol.*, v. 75, n. 3, p. 261-275, mai/jun. 2000.
23. LUPI O. Imunoprofilaxia anti-herpética utilizando vírus geneticamente modificado: vacina DISC. *An. Bras. Dermatol.*, v. 78, n. 3, p. 345-353, mai/jun. 2003.
24. NICHOLS W. W. et al. Pontecial DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 772, p. 30-39, 1995.
25. PARKER S. E. et al. Safety of a GM-CSF adjuvant plasmid DNA malaria vaccine. *Gene Ther.*, v. 8, p. 1011-1023, 2001.
26. PIGNATTI M. G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil. *Ambiente e Sociedade*. v. 7, n. 1. p. 133-148, jan/jun 2004.
27. PISETSKY D. S. Immune response to DNA in systemic lupus erythematosus. *Isr. Med. Assoc. J.*, v. 3, p. 850-853, 2001.
28. REYES-SANDOVAL A.; ERTL H. C. J. DNA vaccines. *Current molecular medicine*, v. 1, p. 217-243, 2001.
29. RODRIGUES J. M. J. et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 30, n. 4, p. 468-477, jul/ago. 2004.
30. SAKAI T. et al. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal *Plasmodium yoelii* in A/J mice. *Vaccine*, v. 21, p. 1432-1444, 2003.
31. SRIVASTAVA I. K.; LIU M. A. Gene Vaccines. *Annals of Internal Medicine*, v. 138, n. 138, p. 550-559, apr. 2003.
32. TANG L.; LIU K. Recent advances in DNA vaccines of hepatitis virus. *Hepat. E. Panc. Disea. Intr. V.* 1, n. 2, p. 228-231, may. 2002.
33. TAPIA E. et al. The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microb. Infect.*, v. 5, p. 73-84, 2003.
34. ZHU L. et al. A candidate vaccine DNA elicits HCV specific humoral and cellular immune responses. *World J. Gastroenterol.*, v. 10, n. 17, p. 2488-2492, sep. 2004.

*ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua: Pedro Veria Vidal, 169 – Pantanal
 CEP 88040-010
 Fone: 48 – 3225 0691
 Fone: 48 – 9903 6651
 Email: julicostac@hotmail.com

Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia

Platelet – Rich Plasma and its application in dentistry

Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD¹; Adriana Parisotto Macedo, Ms²; Anna Paula Batschauer, Ms³ & Maria das Graças Carvalho, PhD¹

RESUMO - O gel de plaquetas, constituído essencialmente por plasma rico em plaquetas (PRP), tem sido usado em diversas áreas da Odontologia, visando acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea. O PRP é obtido pela centrifugação em velocidade baixa de uma amostra de sangue, preferencialmente retirada do próprio paciente. Para se obter o gel de plaquetas, adiciona-se ao PRP, íons cálcio e outros componentes, conforme o protocolo escolhido. Os fatores de crescimento derivados das plaquetas possuem ação importante em diversas etapas do reparo tecidual atuando como agentes reguladores e estimuladores dos processos celulares de mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e metabolismo. A literatura revela resultados paradoxais com relação a neoformação óssea após o uso de gel de plaquetas na Odontologia. Uma provável explicação deste fato é a utilização de diferentes protocolos para obtenção de PRP. A obtenção de um número reduzido de plaquetas no PRP, bem como a fragmentação ou ativação precoce das plaquetas durante a coleta e manuseio do sangue, pode resultar na liberação dos fatores de crescimento antes do preparo do gel, o que irá influenciar o sucesso desse procedimento. A perspectiva de utilização do gel de plaquetas, bem como a necessidade de otimização do procedimento de preparo desse, abrem espaço de trabalho para os profissionais da área de análises Clínicas, especialmente àqueles com maior familiarização com o Setor de Hematologia.

PALAVRAS-CHAVE - Plasma Rico em Plaquetas, PRP, Fatores de crescimento derivados das plaquetas, Odontologia.

SUMMARY - Platelet gel, constituted essentially by platelet-rich plasma (PRP) has been utilized in oral reconstructive and maxillo-facial surgery and procedures of reconstruction for implant in Dentistry, in order to accelerate wound healing and bone regeneration. PRP is obtained by centrifuging, at low speed, a blood sample preferentially from own patient. In order to obtain platelet gel, it is added to PRP, calcium ions and other components, according the chosen protocol. Platelet growth factors have an important effect in diverse steps of the tissue repair. They may have a role as regulators and estimulators in cellular processes related to mitogenesis, chemotaxis, differentiation and metabolism. Literature reveals paradoxal results concerning to bone neoformation after using platelet gel in Dentistry. A probable explanation for this fact may be use of different protocols for obtaining PRP. A reduced number of platelets in PRP as well as fragmentation or an early activation of platelets during blood collection and manipulation of the sample may result in loss of platelet growth factors before gel use, precluding clinical benefits of this innovation in Dentistry.

KEYWORDS - PRP, Platelet Derived Growth Factor, Dentistry.

INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 90, o gel de plaquetas, constituído essencialmente por plasma rico em plaquetas (PRP), tem sido usado nas áreas de cirurgia oral, reconstrutiva oral, bucomaxilo-facial e procedimentos de reconstrução para implantodontia, visando acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea. O gel de plaquetas surgiu como uma alternativa viável para minimizar as complicações decorrentes do uso da cola de fibrina, procedimento consagrado há mais de 60 anos. A Odontologia vem se destacando no uso do gel de plaquetas e tem acumulado grande experiência nesta área.

COLA DE FIBRINA

A utilização da cola de fibrina teve início em 1940, quando Young & Medawar (1) usaram uma mistura de trombina bovina e fibrinogênio humano para induzir a formação do coágulo de fibrina na ferida cirúrgica. A dificuldade técnica nesta época, para separar o fibrinogênio dos demais constituintes sanguíneos limitou a utilização desta técnica. Com a evolução da metodologia para fracionamento do plasma, tornou-se possível obter fibrinogênio em concentrações elevadas e a cola de fibrina passou a ser utilizada para acelerar o processo de cicatrização. O princípio de sua utilização consiste em mimetizar a última etapa da coagulação, ou seja, a quebra do fibrinogênio em monômeros de fibrina e formação do coágulo, independente da condição hemostática

do paciente. Além disso, a cola de fibrina mostrou um papel importante nos eventos iniciais do processo de cicatrização, apresentando atividade mitogênica para fibroblastos e células endoteliais e ação quimiotática para condriócitos (2). As propriedades hemostáticas, adesivas e cicatrizantes da cola de fibrina tornaram corrente a sua utilização em cirurgias torácicas, cardiovasculares, neurológicas, oftálmicas, reconstrutivas e odontológicas. Várias preparações comerciais estão disponíveis no mercado (2). No entanto, o risco de transmissão de agentes infecciosos, uma vez que é produzida com fibrinogênio de vários doadores, tem estimulado a reavaliação da sua utilização. Apesar de inúmeras etapas visando eliminar ou inativar os vírus da AIDS e das hepatites e o Herpes simplex, além de outros agentes infecciosos, o uso da cola de fibrina já foi responsabilizado pela transmissão de AIDS (3) e parvovírus B19 (4). Visando eliminar este risco o desenvolvimento de formulações utilizando fibrinogênio autólogo tem sido estimulado. No entanto, a característica reológica das preparações obtidas com fibrinogênio autólogo tem se mostrado menos reprodutiva e satisfatória que as preparações comerciais (5). Além disso, é necessária a coleta de sangue do paciente, por vários dias, para obtenção de um volume suficiente de fibrinogênio. A maior complicação destas preparações está associada ao relato de desenvolvimento de anticorpo anti-fator V bovino pelos pacientes, já que a preparação de trombina bovina continha pequenas quantidades de fator V como contaminante. Esses anticorpos apresentaram reação cruzada com o fator V humano, desencadeando episódios hemorrágicos graves pós-cirúrgicos (6,7).

Recebido em
Aprovado em

¹Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Minas Gerais
²Faculdade de Odontologia/ Universidade Federal de Santa Catarina
³Univali – Universidade do Vale do Itajaí

PLAQUETAS

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados originados de células da medula óssea denominadas megacariócitos. Na formação das plaquetas, minúsculas porções do citoplasma separam-se das regiões periféricas dos megacariócitos através de grandes canais de demarcação plaquetária. A membrana que reveste estes canais surge por invaginação da membrana celular e apresentam continuidade com o espaço extracelular. O contínuo desenvolvimento e a fusão das membranas de demarcação plaquetária produz a separação completa dos fragmentos citoplasmáticos para formar as plaquetas. Um megacariócito pode originar duas a três mil plaquetas (8).

As plaquetas apresentam forma discóide, diâmetro médio de 2 a 3µm e vida média de 6 a 10 dias. O número de plaquetas no sangue circulante varia de 150.000 a 400.000/mm³. Oitenta por cento das plaquetas se encontram na circulação e 20% estão armazenadas no baço e podem mover livremente entre estes dois compartimentos. As plaquetas apresentam um *turnover* fisiológico de aproximadamente dez dias e quando se tornam senescentes, são retiradas da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear principalmente do baço (8,9).

As plaquetas desempenham um papel decisivo no início e na localização da formação do coágulo de fibrina. A atuação das plaquetas no processo hemostático consiste inicialmente no contato e adesão ao local lesado do vaso, por meio da ligação de receptores glicoprotéicos de sua superfície, complexo GP Ib/IX, ao fator von Willebrand presente no plasma ou no subendotélio e, posteriormente, ao colágeno subendotelial. Em seguida, as plaquetas agregam entre si, num processo mediado pela interação do fibrinogênio plasmático com o complexo GP IIb/IIIa. Por fim, as plaquetas agregadas liberam o conteúdo de seus grânulos. As plaquetas possuem dois tipos de grânulos, os grânulos densos, que secretam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina, cálcio, pirofosfato, P-selectina, fator de transformação do crescimento β, catecolaminas e guanosina di e tri fosfato. Os grânulos α, que secretam proteínas com funções diversas, dentre elas os fatores de crescimento plaquetário, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator V, fator plaquetário 4 (PF-4), β-tromboglobulina (β-TG), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), inibidor de plasmina e α-macroglobulina. Ainda não está completamente estabelecido o papel dessas proteínas no mecanismo hemostático (10,11).

O sistema tubular das plaquetas atua como bomba sequestradora de cálcio, fornecendo baixos níveis de cálcio citoplasmático nas plaquetas em repouso. O cálcio tem grande importância no metabolismo das plaquetas, tais como: facilitar a ligação com o fibrinogênio, estimular a formação de pseudópodos (retração plaquetária) e centralizar os grânulos plaquetários, facilitando a fixação dos pseudópodos e agregação (10,11).

FATORES DE CRESCIMENTO DERIVADOS DAS PLAQUETAS

As plaquetas participam ativamente no processo de reparo das feridas, sendo os primeiros componentes presentes no local do trauma e apresentam propriedades antiinflamatórias e regenerativas (11). Uma vez ativadas liberam fatores de crescimento presentes nos grânulos alfa, que têm um papel importante no processo de cicatrização. Estes fatores de crescimento constituem um grupo de polipeptídeos que tem uma ação importante em diversas etapas do reparo te-

cidual atuando como agentes reguladores e estimuladores dos processos celulares de mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e metabolismo. Estes fatores incluem uma série de proteínas, denominadas genericamente como fatores de crescimento derivados das plaquetas. Dentre esses, destacam-se o fator de crescimento derivado das plaquetas (*Platelet Derived Growth Factors* - PDGF); que apresenta três isômeros (PDGF-αα, PDGF-ββ e PDGF-αβ); fator transformador do crescimento β (*Transforming growth factors*-TGF-β); com dois isômeros (TGF-β1 e TGF-β2); fator de crescimento semelhante a insulina (*Insulin-like growth factor* 1); com dois isômeros (IGF-1 e IGF-2); fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*); fator de crescimento epitelial (*Epithelial growth factor*-EGF); fator de angiogênese derivado da plaqueta (*Platelet-derived angiogenesis factor*) e fator plaquetário 4 (*Platelet factor 4*- PF-4) (12,13).

O PDGF possui um efeito mediador regulando a migração, proliferação e síntese de matriz de uma variedade de células. Trata-se de uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 30kd. Embora seja o principal fator de crescimento nas plaquetas, também é sintetizado e secretado por macrófagos e células endoteliais. Estima-se que cada plaqueta contém cerca de 1200 moléculas de PDGF. Esse é o primeiro fator de crescimento na ferida e possui um papel importante na revascularização, síntese de colágeno, regeneração óssea, além de atuar nos mecanismos de mitose e angiogênese, constituindo uma fonte para outros fatores de crescimento atuarem (14,15).

O fator transformador do crescimento β (TGF-β) é sintetizado pelas plaquetas e também por macrófagos, osteoblastos, fibroblastos e alguns outros tipos celulares. Este fator está relacionado ao reparo do tecido conjuntivo e regeneração óssea. Suas funções mais importantes incluem a quimiotaxia e mitogênese dos osteoblastos, estimulando a deposição de colágeno para formação óssea e cicatrização da ferida. Além disso, inibem a formação de osteoclastos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (12,15).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é secretado pelas plaquetas e osteoblastos. Possui massa molecular de aproximadamente 7,5 kd (15,16,17). Este fator liga-se ao mesmo receptor que a insulina e está envolvido no desenvolvimento de muitos tecidos, inclusive o dente. Constitui um fator importante para a sobrevivência de células hematopoéticas, fibroblastos e células do tecido nervoso (15,16).

O fator de crescimento endotelial (EGF) estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular, induzindo o crescimento de tecido epitelial. O EGF é produzido pelas plaquetas, glândulas salivares e duodenais, e é também encontrado na urina. Este fator tem um efeito proliferativo celular nos fibroblastos periosteais e células endoteliais (12,18).

A ação conjunta dos fatores de crescimento derivados das plaquetas resulta na sinalização para que células mesenquimais e epiteliais migrem para o local lesado, sofrem divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno, resultando assim em uma cicatrização mais rápida e eficiente. Além disto, outras proteínas das plaquetas como fibrina, fibronectina e vitronectina, atuam promovendo a adesão celular e osteocondução (12, 14,18).

As principais atividades dos fatores de crescimento derivados das plaquetas consistem na mitogênese das células de cicatrização, na angiogênese resultante de mitoses de células endoteliais dos capilares locais e na ativação de macrófagos que promovem a fagocitose de *debris* da região e reparos contínuos para posterior regeneração óssea (12,14,18).

GEL DE PLAQUETAS (OU PRP)

O concentrado plaquetário ou plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido pela centrifugação do sangue recém colhido utilizando citrato de sódio como anticoagulante, em velocidade baixa, de modo a sedimentar as hemácias e manter os leucócitos e as plaquetas em suspensão no plasma. Esse, então, é transferido para outro tubo e constitui o Plasma Rico em Plaquetas. Este processo permite a concentração de grande número de plaquetas em condições de liberar os fatores de crescimento, em um pequeno volume de plasma. O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha, pois não altera os receptores de membrana das plaquetas (19). O uso de sangue autólogo para o preparo do PRP é recomendado considerando a possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas pelo uso de sangue e seus derivados, provenientes de outro indivíduo. Um outro fato importante a ser observado pelos Serviços que se responsabilizam pelo preparo do gel de plaquetas é o uso de ácido acetil salicílico ou outros medicamentos que interferem na função plaquetária, nos últimos 7 a 10 dias que precedem a coleta do sangue do paciente.

Para o preparo do PRP em laboratórios clínicos é fundamental observar as condições assépticas de manipulação do sangue, de modo a evitar sua contaminação. A contagem do número de plaquetas tanto no sangue, como no PRP, em hipótese alguma, poderá ser realizada no contador eletrônico de células, considerando que a agulha do contador que faz a aspiração da amostra, não é estéril e entra em contato diretamente com as amostras de sangue da rotina do laboratório. Portanto, é absolutamente necessário que a avaliação do número de plaquetas, tanto da amostra de sangue, quanto do PRP, seja feita em uma alíquota do material.

Diversos protocolos para preparação do gel de plaquetas contendo PRP têm sido propostos com o objetivo de obter um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (20,21,22,23). A coleta do sangue deve ser tecnicamente perfeita, preferencialmente utilizando seringas plásticas e tubos plásticos ou siliconizados, de modo a prevenir a ativação das plaquetas. A centrifugação excessiva do sangue pode resultar em fragmentação das plaquetas e comprometer a eficiência do gel. O manuseio inadequado do sangue pode resultar na ativação das plaquetas e na exocitose granular com conseqüente liberação dos fatores de crescimento antes da sua aplicação na ferida cirúrgica. A avaliação da atividade biológica dos fatores de crescimento derivados das plaquetas é complexa, de modo que não há como avaliar previamente a qualidade do gel produzido (24).

A gelificação do PRP é obtida pela adição de íons cálcio (frequentemente é utilizado o cloreto de cálcio ou o gluconato de cálcio a 10%, na proporção de uma parte para cada dez de PRP). Alguns protocolos adicionam também trombina autóloga ou bovina. Outros homogeneizam o PRP com osso particulado, biocerâmica, etc. Tais procedimentos visam a obtenção de um material de consistência mais sólida, na forma de gel, o que facilita consideravelmente sua aplicação na ferida cirúrgica.

USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM ODONTOLOGIA

A partir de 1995, vários estudos têm avaliado o uso do PRP na área da Odontologia, especialmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar para futuros implantes dentários e em cirurgias periodontais e maxilo-faciais.

Os resultados da associação do PRP com enxertos ósseos têm demonstrado uma consolidação mais rápida e uma minera-

lização do enxerto em 50% do tempo requerido, além de um aumento de 15 a 30% na densidade do osso trabecular (25). Marx (25), relatou que a eficiência dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas ocorre desde o início da cirurgia, contribuindo para a neoformação óssea desde o primeiro estágio, determinando a aceleração no reparo dos tecidos e produzindo um tecido ósseo de maior densidade.

Anitua (26), em um estudo clínico onde foram avaliados vinte pacientes submetidos à extração dentária prévia à colocação de implantes, verificou que os alvéolos tratados com PRP apresentaram maior espessura óssea vestibulo-lingual e melhor epiteliação que o grupo que não recebeu PRP (grupo-controle). Esse mesmo autor relatou o uso de PRP em outros 250 pacientes com evidência de sucesso clínico.

Marx e Garg (27) sugeriram o uso do PRP nos casos que apresentam menores chances de sucesso nos enxertos ósseos e osseointegração como, por exemplo, no edentulismo total (maxilas gravemente reabsorvidas), nos pacientes com osteoporose e nos casos de doença dentária com subseqüente alteração nos tecidos adjacentes.

Carlson (28) enfatizou as perspectivas da utilização do PRP em enxertos autólogos como um grande avanço do século XXI.

Os fatores de crescimento, embora liberados conjuntamente pelos grânulos alfa plaquetários, atua em momentos distintos. Inicialmente o PDGF atua na angiogênese e na diferenciação celular inicial. O TGF- β aprimora a diferenciação celular e conjuntamente estimula a maturação celular. O IGF-I termina a maturação e programa a consolidação da cicatrização através de estímulo de outras células (29).

Carlson e Roach (30), em um estudo retrospectivo das publicações sobre PRP em Odontologia, constataram que o uso do PRP obteve sucesso na grande maioria dos relatos. Da mesma forma Pacifici et al (31) concluíram que o PRP é uma fonte atóxica, não imunogênica de fatores de crescimento, e capaz de acelerar o processo normal do reparo ósseo.

Gil et al (32) relataram os efeitos benéficos de reconstrução em fendas alveolares com enxerto ósseo autólogo associado ao PRP. Os autores enfatizaram as vantagens de cicatrização mais rápida da mucosa e do enxerto, além de possibilitar o uso de área doadora com menor volume de enxerto.

Estudos experimentais em animais, onde foram realizadas análises histológicas e histomorfométricas, concluíram que a aplicação do PRP acelera a atividade de regeneração óssea em sítios de implantes durante as fases precoces do reparo (33).

Sanchez et al (34) também consideraram uma evidência científica o uso do PRP em combinação com enxertos ósseos nas cirurgias reconstrutivas, constatando a opinião unânime de aceleração e melhora da qualidade do osso regenerado. A associação do PRP com produtos xenógenos mostrou-se eficaz em 21 pacientes com defeitos periodontais (35), confirmando estudos clínicos anteriores (36).

Um estudo clínico em implante imediato em maxilas gravemente reabsorvidas, utilizando produtos xenógenos e PRP, revelou um sucesso inquestionável (37).

Wojtowick et al (38), observando os efeitos da associação do PRP com material xenógeno, sugeriram que mecanismos genéticos influenciaram a organização do padrão trabecular do tecido ósseo regenerado, provavelmente sob a influência de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas. Por outro lado, alguns autores têm questionado o papel do PRP na osteoindução (25,38,39,40,41).

A discordância de conclusões entre os estudos que avaliam o papel do PRP na neoformação óssea pode ser explicada, pelo menos em parte, pela utilização de diferentes protocolos para obtenção de PRP. A obtenção de um número reduzido de plaquetas no PRP, bem como a fragmen-

tação ou ativação precoce dessas durante a coleta e manuseio do sangue, podem resultar na liberação dos fatores de crescimento antes do preparo do gel, o que irá influenciar o sucesso desse procedimento.

Gasparini (42) avaliou 30 pacientes e determinou uma maior contagem de plaquetas no PRP, após a centrifugação dupla da amostra, o que vem reforçar a idéia de que diferentes procedimentos laboratoriais para a obtenção de PRP podem interferir decisivamente no sucesso desta preparação, minimizando o efeito benéfico esperado.

USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM OUTRAS ÁREAS

A utilização do gel de plaquetas em outras áreas médicas é crescente. O PRP tem mostrado grande potencial para melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura, bem como para estimular a cicatrização de feridas. Nas cirurgias que envolvem retalhos cutâneos, como mamoplastias, abdominoplastias e ritidoplastias, o uso do PRP resulta no desenvolvimento de um tecido de granulação de melhor qualidade, com uma vascularização mais intensa, diminuindo assim complicações como hematomas. Na cirurgia plástica cosmética, o uso do PRP tem tido resultados positivos (43,44). No enxerto de pele é observado que o PRP torna a primeira troca de curativo menos dolorosa e a epitelização da ferida mais rápida (22). No campo da Ortopedia, o uso do PRP ao tratamento convencional, tem sugerido perspectivas animadoras no tratamento de fraturas (45), tendinite (46) e osteomielite crônica (47). No campo da engenharia de tecidos, o PRP estimulou o crescimento inicial e a diferenciação de células de medula óssea de rato (48).

CONCLUSÃO

Diante dos benefícios potenciais aventados por diversos autores, bem como das controvérsias observadas por outros, acerca dos possíveis efeitos benéficos do PRP, torna-se imprescindível maior número de estudos, com variáveis rigorosamente controladas. Para estabelecer o benefício real quanto à utilização de tais preparações em Odontologia e em outras áreas clínicas, métodos altamente padronizados e confiáveis para a obtenção do PRP e do gel de plaquetas devem ser utilizados e desenvolvidos por profissionais altamente qualificados. Não apenas o número de plaquetas das preparações deve ser observado, mas também os aspectos qualitativos, ou seja, a função das plaquetas. Um número considerável de plaquetas, porém com viabilidade comprometida certamente não proporcionará o efeito desejado, já que os fatores de crescimento, cruciais para o sucesso da preparação, já podem ter sido eliminados em consequência de procedimentos inadequados.

A perspectiva de utilização do gel de plaquetas, bem como a necessidade de otimização do procedimento de preparo desse, abrem espaço de trabalho para os profissionais da área de análises Clínicas, especialmente àqueles com maior familiarização com o Setor de Hematologia.

REFERÊNCIAS

- Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet*, 1:126, 1940.
- Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95:521-8, 2003.
- Wilson SM, Pell P, Donegan EA. HIV-1 transmission following the use of cryo-

precipitated fibrinogen as gel/adhesive. *Transfusion*, 31(8 suppl):8S-14S, 1991.

- Hino M, Ishiko O, Honda KI, Yamane T, Otha K, Takubo T, Tatsumi N. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *Br J Haematol*, 108:194-5, 2000.
- Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox San*, 72:133-43, 1997.
- Cmolik BL, Spero JA, Magovern GJ, Clark RE. Redo cardiac surgery: Late bleeding complications from topical thrombin induced factor V deficiency. *J thorac Cardiovasc Surg*, 105:222-225, 1993.
- Christie RJ, Carrington L, Alving B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: Report of two cases. *Surgery*, 121:708-710, 1997.
- Handin RJ, Lux SE, Stossel TP. *Blood: principles, practice of Hematology*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. 2305p.
- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 1081p.
- Gerrard JM. Platelet aggregation: cellular regulation and physiologic role. *Hosp Pract*, 23:89-92, 1988.
- Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation. *Blood*, 74:1181-4, 1989.
- Tönzüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95(5):521-8, 2003.
- Freymler EA, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: Ready or not? *J Oral maxillofac Surg*, 62:484-8, 2004.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral maxillofac Surg*, 59:1119, 2001.
- Syroid DE, Zorick TS, Arbet-Engels C, Kilpatrick TJ, Eckhart W, Lemke G. A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. *J Neurosci*, 19(6):2059-68, 1999.
- Joseph BK, Savage NW, Daley TJ, Young WG. In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insulin-like growth factor I in tooth development. *Growth Factors*, 13(1-2):11-7, 1996.
- Beilharz EJ, Bassert NS, Sirimanne ES, Williams CE, Gluckman PD. Insulin-like growth factor II is induced during wound repair following hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 29(1):81-91, 1995.
- Hudson-Goodman P, Girard N, Jones MB. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung*, 19:379-84, 1990.
- Han P, Ardlie NG. Influence of pH, temperature, and calcium on platelet aggregation: Maintenance of environmental pH and platelet function for in vitro studies in plasma. *Br J Haematol*, 26:373-6, 1974.
- Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62:489-496, 2004.
- Gasparini G. Análise quantitativa do protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas do núcleo de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial do HU-UFSC. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do HU-UFSC) Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Rev Col Bras Cir*, 33(1): 24-28, 2006.
- Weibrich G, Kleis WKG. Curasan PRP kit vs PCCS PRP system: Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet rich plasma. *Clin Oral Implant Res*, 13:437-436, 2002.
- Landsberg R, Roy M, Glickman R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J. Maxillofacial Surg*, 58: 297-301, 2000.
- Marx RE, Carlson ER, Fichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet Rich Plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85:638-641, 1998.
- Anitua E. Plasma rich in growth factors: a preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral and Maxillofacial Implants*, 14(4): 529-535, 1999.
- Marx R, Garg AK. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. In: Jensen O. T. The sinus bone graft. Chicago: Quintessence, 1999. p. 183-189.
- Carlson E R. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-

- rich bone morphogenetic protein. *Alpha Omegan*,93(3):26-30,2000.
29. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,85:638-46,1998.
 30. Carlson, NE, Roach Jr RB. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J.Am.Dent.Assoc*,10(133):1383-1386, 2002.
 31. Pacifici L, Casella F, Maggiore C. Platelet rich plasma (PRP): potencialities and techniques of extration. *Minerva Stomatol*,51(7-8):341-350, 2002.
 32. Gil JN. Emprego de plasma rico em plaquetas na reconstrução de fendas alveolares -apresentação de caso clínico. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*,9(35):197-201,2002.
 33. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, Mailath T, Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int. J. Oral and Maxillofacial Implants*,1(18):15-22, 2003.
 34. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int. J. Oral and Maxillofacial Implants*,1(18):93-103, 2003.
 35. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment on intrabony defects: areentry study. *J. Periodontol*,2(73):198-205, 2002.
 36. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J. Periodontol*,10(71):1654-1661, Oct. 2000.
 37. Rodriguez A. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implant. *J. Oral and Maxillofacial Surg*,2(61):157-163, 2003.
 38. Wojtowicz A, Chaberek S, Kryst L, Urbanowska E, Ciechowicz K, Ostrowski K.. Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. *Int. J. Oral and Maxillofacial Surg*,1(32):84-86, 2003.
 39. Shanaman, R. et al. Localized ridge augmentation using GRB and platelet-rich plasma: case report. *Int. J. of Periodontics and Restorative Dentistry*,21(4):345-355, 2001.
 40. Venturelli, A. Regeneración ósea: plasma rico en plaquetas. *Rev. Assoc.Odontol.Argent*,87(6):459-467,1999.
 41. Oklund, SA. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts and allografts in canine skull defects. *Clin. Orthop*,205:269-291, 1986.
 42. Gasperini, G. Análise quantitativa do protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas do núcleo de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial do HU-UFSC. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do HU-UFSC) Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
 43. Sclafani AP, Romo T, Ukrainsky G, McCormick SA, Litner J, Kevy SV, Jacobson MS. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Arch Facial Plast Surg*,7(3):163-9,2005.
 44. Adler SC, Kent KJ. Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2002; 10(2):129-146.
 45. Ghandi A, Dumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma on diabetic fracture healing. *Bone*,38(4):540-546,2006.
 46. Dumas GA, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, 38(6):540-6.
 47. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santagelo KS, Fortier LA. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*, 2006 (in press).
 48. Acosta-Feria M, Infante-Cossio P, Hernandez-Guisado JM, Torres-Carranza E, Garcia-Perla A, Belmonte-Caro R, Gutierrez-Perez JL. Frontal sinus obliteration using tibial bone and platelet rich plasma for the treatment of chronic osteomyelitis. *Neurocirugia*,17(4):351-356,2006.
 49. Dolder JV, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. Platelet rich plasma: Quantification of Growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006 (in press)

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Luci Maria Sant'Ana Dusse
 Faculdade de Farmácia/UFMG Sala 4104 - Bloco 3
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 CEP: 31270-901 Belo Horizonte – Minas Gerais
 Fone: 31 3499-6880 - Fax: 31 3499-6895
 E-mail: lucim@farmacia.ufmg.br

A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura

The importance of immunophenotyping and cytogenetics in the diagnosis of leukemia: a literature review

Valéria Bernadete Leite Quixabeira¹ & Vera Aparecida Saddi²

RESUMO - As leucemias são grupos heterogêneos de neoplasias hematológicas, que resultam da transformação total ou parcial das células blásticas. Vários critérios, dentre eles a morfologia, a citocímica, a imunofenotipagem e a detecção de alterações genéticas constituem a base para classificação das neoplasias hematológicas. A imunofenotipagem, realizada com a técnica de citometria de fluxo (CMF), é útil tanto no diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, monitoramento, como na caracterização fenotípica das leucemias. Contudo, as análises citogenéticas e moleculares permitem uma definição mais precisa no diagnóstico das leucemias. Análises citogenéticas e moleculares possibilitam a detecção de alterações cromossômicas e genéticas das células leucêmicas, correlacionando-as com o diagnóstico, a classificação, a caracterização de diferentes estágios, a avaliação da remissão e prognóstico destas enfermidades. As duas metodologias não se excluem mutuamente, mas, podem em conjunto beneficiar tanto o analista quanto o paciente, que certamente receberá um tratamento mais adequado e mais eficaz.

PALAVRAS-CHAVE - leucemias, diagnóstico, imunofenotipagem, citometria de fluxo, citogenética

SUMMARY - Leukemia is a heterogeneous group of hematological malignancies, resulting from the total or partial transformation of blastic cells. Several criteria, including cell morphology, cytochemistry, immunophenotyping, and the detection of genetic alterations are the basis for the classification of such hematological diseases. Immunophenotyping, performed with flow cytometry, is extremely useful for staging, diagnosis, classification, prognosis, and disease monitoring. However, cytogenetic and molecular analyses provide more precise diagnosis. Cytogenetics and molecular analyses describe the chromosomal changes in leukemic cells, and are useful for the correlation with diagnosis, classification, staging, prognostic and disease monitoring. The two methods do not exclude each other, but they can be used together in order to favor the clinical diagnosis as well as the patient that will surely receive a more suitable and efficient treatment.

KEYWORDS - leukemia, diagnostic, immunophenotyping, flow cytometry, cytogenetic.

INTRODUÇÃO

As leucemias são grupos heterogêneos de neoplasias hematológicas, que resultam da transformação total ou parcial das células blásticas. A perda parcial da capacidade de diferenciação e o tipo de linhagem comprometida representam as bases para a classificação destas neoplasias.^{18,19,20} As leucemias podem ser classificadas de várias maneiras: (1) pela morfologia e citocímica, complementada pela imunofenotipagem, proposta pelo grupo French-American-British (FAB); (2) pela morfologia, imunofenotipagem e citogenética, proposta pelos grupos MIC (classificação morfológica, imunológica e citogenética); (3) pela imunofenotipagem somente, proposta pelo grupo European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL); (4) por eventos antecedentes; (5) pela natureza da célula progenitora na qual a mutação leucemogênica ocorreu.²⁰

BASES IMUNOFENOTÍPICAS DA CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

A imunofenotipagem, realizada com a técnica de citometria de fluxo (CMF), é útil tanto no diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, monitoramento, como na caracterização fenotípica das células hematopoiéticas patológicas.^{5,14} A CMF avalia as propriedades celulares, na medida em que as células se movem em uma solução isoeletrolítica, através de um conjunto de detectores de fluorescência. Foi definida por Mendelsohn em 1979, como sendo o movimento de uma suspensão celular, que atravessa um canal de fluxo, uma a uma, promovendo o desvio da luz incidente que é medido por um detector.¹⁰

A CMF é uma técnica multi-paramétrica, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorescência para analisar qualitativa e quantitativamente padrões de expressão de antígenos (*clusters designations* - CDs) em populações celulares de interesse.¹¹ A metodologia permite a análise de 10^5 a 10^6 células por minuto, medindo simultaneamente as propriedades físicas e químicas de tais células.¹⁰

A CMF tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos e suas aplicações são amplas, tanto em laboratórios de pesquisa quanto nos laboratórios clínicos. A técnica oferece objetividade, sensibilidade, rapidez e precisão na análise das características celulares, incluindo o conteúdo de DNA/RNA, a detecção e quantificação de antígenos celulares, a análise de resistência celular a drogas e a análise de conteúdo citoplasmático.¹⁸

O equipamento utilizado para a técnica é denominado citômetro de fluxo e possui quatro componentes principais, incluindo um laser que incide sobre as células, fotodetectores de sinais, suspensões celulares marcadas com anticorpos fluorescentes e um computador ligado ao sistema. O computador elabora gráficos e histogramas, divididos em regiões de parâmetros de fluorescência denominadas FL1, FL2, FL3, FL4, etc., que possibilitam a análise de populações celulares diferentes, dentro de uma mesma amostra, desde que marcadas com fluorocromos distintos.^{10,18}

Os parâmetros celulares avaliados pelo método podem ser divididos em dois principais grupos, os evidenciados pela luz dispersa (que refletem o tamanho celular e complexidade interna FSC- *forward scatter* e SSC- *side scatter* respectivamente) e os associados à presença de um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos que reconhecem moléculas celulares específicas, refletindo características fenotípicas.

Recebido em
Aprovado em

¹Aluna do curso de Especialização em Genética do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás – UCG; Aluna do curso de Mestrado em Genética do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás. Goiânia, Goiás, Brasil

²Profa. dos Departamentos de Biologia, Biomedicina e Medicina da Universidade Católica de Goiás. Goiânia, Goiás, Brasil e Pesquisadora do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás

picas importantes, como grau de diferenciação celular, linhagem celular, ploidia, expressão de proteínas apoptóticas, dentre outras.¹⁸

As suspensões celulares são aspiradas e passam em fila para o interior do citômetro através de um canal de fluxo no qual incide um laser. Nesse mesmo local, detectores internos captam e enviam sinais fluorescentes que são medidos por um computador. Os sinais fluorescentes são plotados em gráficos com escala logarítmica ou linear, o que possibilita a distinção entre populações celulares normais e patológicas.^{10,18} Cada fluorocromo usado na marcação de anticorpos possui um padrão espectral específico de absorção e de emissão de luz. Os fluorocromos mais utilizados são o *isotiocianato de fluorceína* (FITC) e a *ficoeritrina* (PE), que emitem luz com diferentes comprimentos de onda. O uso de fluorocromos múltiplos, com diferentes comprimentos de onda, possibilita a análise de parâmetros distintos ou de populações celulares diversas em uma mesma suspensão celular.^{18,21}

Em relação à microscopia convencional, a CMF apresenta inúmeras vantagens para a análise de células hematopoiéticas, principalmente no que diz respeito às limitações de interpretação e resolução do microscopista. A CMF apresenta alta sensibilidade, especificidade e precisão, permitindo análises multiparamétricas de um grande número de células em pequeno intervalo de tempo.¹⁹

A distinção entre células hematopoiéticas patológicas e células normais presentes na amostra é baseada nos padrões fenotípicos que diferenciam tais populações celulares.¹⁹ Células leucêmicas apresentam características imunofenotípicas de células normais, porém, bloqueadas em um estágio de maturação.^{12,16} Fenótipos aberrantes de células leucêmicas misturam determinantes antigênicos de linhagens celulares (mielóide/ linfóide), assincronia de expressão gênica, fenótipos ectópicos e diferenciação anormal, dentre outras características. Estes fenótipos aberrantes traduzem as anormalidades genéticas presentes nestas células.^{18,19}

A imunofenotipagem requer o isolamento das células hematopoiéticas do sangue periférico ou da medula óssea. As amostras de sangue e medula óssea são tratadas com solução hipotônica de lise de eritrócitos e incubadas com anticorpos monoclonais. A incubação da amostra em solução de lise é uma etapa importante, pois hemácias intactas alteram a dispersão da luz, formando *debris* (restos celulares) que causam resultados imprecisos.^{19,21}

Os fatores que mais afetam os resultados de imunofenotipagem incluem o tipo e a qualidade da amostra, os protocolos de preparação de reagentes e amostras, a calibração e subjetividade durante a análise e a interpretação dos resultados, que fazem da padronização uma necessidade desta metodologia.^{19,21}

Um consenso geral atesta a imunofenotipagem como uma modalidade de diagnóstico primário para várias desordens hematopoiéticas, incluindo as linfoproliferativas crônicas, linfomas não-Hodgkin, leucemias agudas, crises blásticas, desordens mieloproliferativas crônicas e síndromes mielodisplásicas.^{2,19}

Nas neoplasias hematológicas, a imunofenotipagem é relevante tanto para o diagnóstico, a classificação, o prognóstico e o monitoramento, enquanto que nas desordens mieloproliferativas, apresenta valor somente para o monitoramento. A tabela 1 especifica as indicações médicas da imunofenotipagem por CMF.²

De acordo com o Consenso da Segunda Conferência da América Latina para Imunofenotipagem de Malignidades Hematológicas por Citometria de Fluxo, ocorrida em 3 e 4

de maio de 2005, no México, os painéis de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem são montados de acordo com os sinais clínicos dos pacientes e os achados morfológicos e citoquímicos previamente analisados. Nas leucemias agudas, o painel utilizado deve ser capaz de distinguir entre leucemia linfóide aguda da linhagem T, leucemia linfóide aguda com células B precursoras, leucemia mielóide aguda e leucemia aguda bifenotípica. Nas leucemias linfoproliferativas crônicas que envolvem células da linhagem T, é necessário demonstrar a clonalidade celular com estudo do repertório do TCR (Receptor de células T), enquanto que nas neoplasias de células da linhagem B, faz-se necessário o estudo das cadeias Kappa e Lambda individualizadas, bem como das imunoglobulinas íntegras.² Quando uma leucemia expressa dois ou mais marcadores de linhagem celular é considerada bifenotípica. A tabela 2 resume as principais recomendações do Consenso.^{2,4,13}

BASES GENÉTICAS DA CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

As anormalidades genéticas que ocorrem nas leucemias, podem ser divididas em duas principais categorias, aquelas que incluem alterações cromossômicas estruturais, principalmente translocações e inversões, e aquelas associadas às alterações de expressão gênica.^{3,6,15} As translocações cromossômicas resultam da mudança de posição de um gene ou de um fragmento gênico para uma diferente região cromossômica, resultando em genes quiméricos com funções aberrantes. Muitas vezes, a translocação inclui mudança de região regulatória de um gene para outro, localizado em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, com conseqüente alteração do nível de expressão do gene translocado ou do gene quimérico.⁶ Outras modificações cromossômicas, como deleções (perda de um fragmento cromossômico) ou inversões (reorganização de um fragmento dentro do cromossomo), também estão envolvidas no aparecimento das leucemias.¹⁶

Na maioria das leucemias, as categorias genotípicas podem ser presumidas com base na detecção de marcadores moleculares por meio da imunofenotipagem. Contudo, a confirmação citogenética e molecular das leucemias permite tanto a definição do diagnóstico, como a melhor classificação das desordens leucêmicas, possibilitando inferências sobre o prognóstico destas enfermidades, a caracterização dos diferentes estágios e a possibilidade de remissão.⁷

As análises citogenéticas das neoplasias hematológicas podem fornecer várias informações, tais como: clonalidade celular na neoplasia hematopoiética; evidência da linhagem celular do clone neoplásico; indicação dos mecanismos de leucemogênese; demonstração de fatores etiológicos implicados no processo neoplásico; confirmação do diagnóstico; informação sobre a classificação e estadiamento da neoplasia; indicação de prognóstico; evidência da regressão da doença; acompanhamento de transplantes de medula óssea. Com a evolução dos estudos genéticos das células leucêmicas, surgem várias questões sobre a utilização destes achados, tais como: – É preciso modificar a classificação imunofenotípica das células neoplásicas com a análise do padrão genotípico encontrado? – É aconselhável utilizar os achados

genéticos somente como acompanhamento do tratamento do paciente? – Como correlacionar o genótipo com padrões específicos de expressão de antígenos e a variabilidade fenotípica? – Quais os mecanismos regulatórios que permitem a expressão de moléculas aberrantes nas células leucêmicas?⁸ Anormalidades citogenéticas são identificadas em 60 a 80% dos casos de leucemia mielóide aguda e aproximadamente em 80% dos casos de leucemia linfóide aguda, incluindo tanto anormalidades numéricas quanto estruturais.⁸ A classificação da leucemia mielóide crônica pode ser baseada na morfologia das células e/ou no cariótipo, enquanto que nas leucemias linfóides crônicas, a classificação é baseada nas características morfológicas e imunofenotípicas, sendo a análise citogenética auxiliar na diferenciação entre a linhagem comprometida, ou seja T ou B, além de colaborar para avaliação prognóstica.²² Várias técnicas têm sido empregadas na avaliação genética das leucemias, incluindo a citogenética convencional, a citogenética molecular (FISH: hibridização fluorescente *in situ*; CGH: hibridização genômica comparativa), além dos métodos de biologia molecular como *Southern blotting*, amplificação de DNA ou RNA por PCR (reação em cadeia da polimerase), a PCR em tempo real e a hibridização *in situ*, dentre outras.^{6,9,15} O desenvolvimento das técnicas moleculares e dos métodos citogenéticos possibilitou o aparecimento da classificação MIC das leucemias, considerando as características moleculares, imunológicas e citogenéticas.^{3,11} As anormalidades associadas às alterações cromossômicas estruturais, principalmente as translocações e inversões e as alterações de expressão gênica variam de acordo com o tipo de leucemia.⁸ A tabela 3 resume as principais anormalidades genéticas descritas nas neoplasias hematopoiéticas.^{3,8,16}

TABELA I
Indicações Médicas da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo.

Utilidade	LLA	LMA	DLPC	SMD	DMP	GM
Diagnóstico	Não	Não	Sim	Sim ^a	Não ^b	Sim
Classificação	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Prognóstico e Extensão	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Monitoramento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Abreviações: LLA, Leucemia Linfóide Aguda; LMA, Leucemia Mielóide Aguda; DLPC, Desordens Linfoproliferativas Crônicas; SMD, Síndrome Mielodisplásica; DMP, Desordens Mieloproliferativas; GM, Gamopatas Monoclonais. a A imunofenotipagem pode ser usada como diagnóstico diferencial entre Leucemia Aguda e Síndrome Mielodisplásica. b A imunofenotipagem não é indicada nas Desordens Mieloproliferativas (DMP) enquanto a doença permanecer crônica ou estável, mas pode ser útil para o monitoramento do curso da doença. (Tabela adaptada de Ruiz-Argüelles et al., 2005).¹⁵

TABELA II
Marcadores utilizados para imunofenotipagem por CMF

Linhagem	Maturação celular	Subclassificação	Marcadores opcionais
LLA-T	CD2, CD7, CD3 _{cy}	CD34, CD45	TdT
LLA-B	CD19, CD79 ^a	HLA-DR, CD34, CD45	CD10, Igs d e membrana
LMA	MPO _{cy} , CD13, CD33, CD117 ^a	HLA-DR, CD34, CD45	CD15
LLC-B	CD19, CD56, Kappa, Lambda		CD5, CD22, CD23, FMC7, CD10, CD38, CD11c, CD103, CD25, CD16
LLC-T	CD4, CD8, CD3, CD56		CD7, TCR ^{a,b}

Legenda: LLA-T: Leucemia Linfóide Aguda da Linhagem T, LLA-B: Leucemia Linfóide Aguda da Linhagem B, LMA: Leucemia Mielóide Aguda, LLC-B: Leucemia Linfóide Crônica da Linhagem B, LLC-T: Leucemia Linfóide Crônica da Linhagem T. CD: Clusters Designations. Tabela adaptada de Ruiz-Argüelles et al., 2005).¹⁵

TABELA III
Classificação e prognóstico de leucemias de acordo com as alterações genéticas.^{3,8,16}

Alteração cromossômica	Tipo de leucemia	Prognóstico
t(4;11) MLL/AF4	LLA-B	PIOR
t(12;1) TEL/AML1	LLA-B	FAVOR ÁVEL
HIPERDIPLOIDIA	LLA-B	FAVOR ÁVEL
t(9;22) BCR/ABL	LLA-B	DESFAVOR ÁVEL
t(1;19) E2A/PBX1	LLA-B	DESFAVOR ÁVEL OU COM UM
TAL1 deletion SIL -TAL1	LLA-T	...
t(8;14)(q24;q11) c-MYC -TRCA/D	LLA-T	...
t(11;14)(p15;q11) LMO 1-TCRD	LLA-T	...
t(11;14)(p13;q11) LMO2 -TCRD	LLA-T	...
t(11;14)(p34;q11) TAL1 -TCRD	LLA-T	...
t(10;14)(q24;q11) HOX11 -TCRD	LLA-T	...
t(8;21) AML1/ETO	LMA (FAB M2)	FAVOR ÁVEL
t(15;17) PML/RARa	LMA (FAB M3)	FAVOR ÁVEL
Inv16CBFb/SMMHC	LMA (FAB M4)	FAVOR ÁVEL
11q23	LMA (FAB M4/M5)	INTERMEDIÁRIO OU DESFAVOR ÁVEL
t(1;22) OTT/LAM	LMA (FAB M7)	DESFAVOR ÁVEL
TRISSOMIA DO 12	LLC	...
t(11;14)(q13;q32)	LLC	...
t(9;22) BCR - ABL	LMC	FAVOR ÁVEL

DISCUSSÃO

As doenças genéticas podem ser classificadas como doenças gênicas, envolvendo um único gene e com padrão de herança específico; cromossômicas, envolvendo vários genes localizados em um segmento cromossômico; doenças multifatoriais, comprometendo vários genes e com participação do ambiente; e doenças somáticas, com alteração genética restrita ao tecido somático, sem risco para a prole.⁷ As neoplasias hematopoiéticas são doenças genéticas que apresentam tipos correspondentes a todas estas classes e que podem ser estudados com diferentes níveis de resolução. As doenças neoplásicas envolvem multiplicação e disseminação descontroladas de células anormais, com alterações nos processos de diferenciação e proliferação celulares e que muitas vezes, podem levar a morte de um organismo.^{6,7} A relação entre uma alteração genética e o câncer teve início em 1960, com a descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph1), em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC).¹⁷ O Ph1 é resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, transpondo o segmento 3' do gene ABL para o segmento 5' do gene BCR. O gene BCR, presente no cromossomo 22, não possui função conhecida, enquanto o gene ABL, presente no cromossomo 9, é um protooncogene. O gene resultante da translocação, BCR-ABL, é transcrito em um RNA-mensageiro (mRNA) quimérico e traduzido em uma proteína com localização citoplasmática e atividade aumentada de tirosina-quinase.¹ O material genético pode ser analisado com diferentes níveis de resolução. Quando a análise é realizada em cromossomos e com a utilização de técnicas convencionais, é denominada citogenética. Quando o alvo da análise é a molécula do DNA ou partes dela, a análise é denominada molecular e quando o núcleo interfásico ou a metáfase são analisados em lâminas, com a utilização de estratégias moleculares, a análise é denominada citogenética molecular. As análises citogenéticas e moleculares permitem a detecção de alterações cromossômicas e genéticas das células leucêmicas, correlacionando-as com o diagnóstico, a classificação citogenética das leucemias, a caracterização

de diferentes estágios, a avaliação da remissão e prognóstico destas enfermidades, enquanto que a imunofenotipagem feita por citometria de fluxo evidencia o fenótipo celular.^{3,7,14,18} As duas metodologias não se excluem mutuamente, pelo contrário, podem em conjunto beneficiar tanto ao analista, confirmando e complementando o diagnóstico, como ao paciente, que certamente receberá um tratamento mais adequado e mais eficaz.

CONCLUSÃO

- (1) As leucemias se destacam como exemplos de doenças que apresentam alterações cromossômicas numéricas e ou estruturais altamente consistentes e específicas.
- (2) As alterações genéticas das leucemias envolvem genes, que uma vez alterados qualitativa e quantitativamente, atuam como fatores de iniciação e progressão da doença.
- (3) Os avanços da genética molecular e da citogenética aumentaram significativamente a capacidade de diagnóstico das alterações neoplásicas em células hematopoiéticas, possibilitando, em muitos casos o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela etiologia e patogênese destas neoplasias.
- (4) A citometria de fluxo (CMF) permite análise fenotípica das populações celulares leucêmicas, porém, as análises moleculares e citogenéticas são capazes de demonstrar o genótipo das populações celulares em estudo, possibilitando a melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no aparecimento e evolução da doença, otimizando assim o tratamento do doente.

REFERÊNCIAS

- 1- Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res.* 26(8):713-20, Review; 2002.
- 2- Argüelles AR, Espinoza LR, Duque RE. Report on the Second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. *Cytometry Part B* 70B: 39-44, 2005.
- 3- Bain BJ. Classification of acute leukaemia: the need to incorporate cytogenetic and molecular genetic information. *J. Clin. Pathol.* 51: 420-423, 1998.
- 4- Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34+ or CD34- : which is the more primitive? *Leukemia*, 16: 1603-1608, 2002.
- 5- Bonjean B, Grollet L, Visentin E, Sigaux F, Cayuela JM. Development of a new strategy for minimal residual disease monitoring in children with B-precursor acute lymphoblastic. *Ann Biol Clin* 62(4):465-70, 2004.
- 6- Futreal AP, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat.Rev* 4: 177-182, 2004.
- 7- Fett-Conte AC, Vendrame-Goloni CB, Homsi CM, Borim LNB, Zola PA, Ricci O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto-SP.

Rev.Bras.Hematol.Hemoter, 22(3): 374-386, 2000.

- 8- Hrusak O, MacDonald-Porwit A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 16: 1233-1258, 2002.
- 9- Hoelzer D, Gökbüget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum F R, Jacques JM, Szczepanski T. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol*, 162- 192, 2002.
- 10- Harmening DM. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis, third edition, USA 1997, 740; chapter 24: 452-462; chapter 35: 683-695.
- 11- Harris N L, Jaffe E S, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink H K, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J. Clin. Oncol.*, 17(12): 3835-3849, 1999.
- 12- Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 16: 559-562, 2002.
- 13- Lochem EGV, Velden VHJD, Wind HK, Marvelde JGT, Westerdaal NAC, Dogen JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B* 60B: 1-13, 2004.
- 14- Martins SLR, Falcão RP. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. *Rev. Assoc. Méd. Bras* 46: N°1, 2000.
- 15- Morris CM, Fitzgerald PH. Ph-negative chronic myeloid leukemia: the nature of the breakpoint junctions and the mechanism of ABL transposition. *Leuk. and Lymph.* 6: 277, 1992.
- 16- McKenna RW. Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. *Clin. Chem.*, 46:8 (B) 1252-1259, 2000.
- 17- Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132:1497-1497, 1960.
- 18- Orfao A, Ruiz-Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: Its applications in Hematology. *Haematologica* 80:69-81, 1995.
- 19- Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Argüelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P. Clinically Useful Information Provided by the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies: Current Status and Future Directions. *Clin. Chem.*, 45(10): 1708-1717, 1999.
- 20- Qadir M, Barcos M, Stewart CC, Saint SNJ, Ford LA, Baer MR. Routine Immunophenotyping in Acute Leukemia: Role in Lineage Assignment and Reassignment. *Cytometry Part B* 70B: 329-334, 2006.
- 21- Reilly JT, Barnett D. UK NEQAS for leucocyte immunophenotyping: the first 10 years. *J.Clin.Pathol.* 54: 508-511, 2001.
- 22- Rooney DE, Czepulkowski BH. Human Cytogenetics Vol.II, second edition, Oxford 1992, 293: chapter 4: 97-119.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Vera Aparecida Saddi.
Departamento de Biologia – Núcleo de Pesquisas Replicon
Universidade Católica de Goiás – Área IV – Bloco L
Av. Universitária s/n – Setor Universitário
CEP: 74065-010 Goiânia – GO
E-mail: vsaddi@terra.com.br

Determinação do sexo do feto através de uma nova técnica não invasiva baseada em PCR*

Determination of fetal sex by a new PCR method non invasive

Malta,FSV; Torres,PORB; Ferreira, ACS & Pardini, VC

RESUMO - A determinação do sexo do feto é geralmente realizada pelo procedimento de ultra-som que ocorre no segundo trimestre da gestação, sendo que, quando realizado antes da 13ª semana, esse método se mostra muito incerto.

Técnicas moleculares utilizando o PCR já foram descritas, e possuem maior sensibilidade na determinação do sexo. Dentre estas técnicas existentes, as invasivas consistem em amniocentese ou coleta de amostra de vilo coriônico, seguida de PCR para determinar o sexo e que representam em aumento de risco na gravidez e as técnicas não invasivas que conseguem detectar o DNA fetal no sangue periférico materno. Foi desenvolvida em nosso laboratório uma técnica capaz de detectar o sexo fetal nas primeiras semanas de gestação com alto índice de acerto. A técnica consistiu em desenhar iniciadores que anelassem em regiões repetitivas espalhadas no cromossomo Y e "PCR Nested" para aumentar a acurácia do exame.

Os resultados demonstraram que a técnica possui sensibilidade e especificidade de 100%. Além disso, a PCR foi capaz de detectar em uma diluição seriada de uma amostra de DNA genômico masculina, previamente quantificada, a presença do cromossomo Y em amostras contendo apenas 100 femtogramas de DNA.

PALAVRAS-CHAVE - Sexo, fetal, Nested PCR.

SUMMARY - The determination of fetal sex is currently carried out by ultrasound that is usually performed in the second trimester. However, it is inaccurate before 13th week of gestation. Molecular techniques such as PCR already had been described and were successful of fetal gender. Among these techniques, there are invasive methods: chorionic villus sampling and amniocentesis that are avoided because it is associated with a risk of fetal loss, and the non-invasive procedures that use of fetal DNA circulating in maternal blood. We report a new Nested PCR method with specific primers for repetitive sequences of the Y-chromosome.

Our results indicated that sensitivity and specificity of the method were 100% and we can accurately detect Y-chromosome sequences in samples with only 100 femtograms of DNA template.

KEYWORDS - Sex, fetal, Nested PCR.

INTRODUÇÃO

A determinação do sexo do feto pode ser realizada através de diversas técnicas, invasivas ou não invasivas. As técnicas invasivas como por exemplo, a amniocentese ou coleta de amostra de vilo coriônico, por apresentarem riscos ao feto não justificam sua utilização apenas para a determinação do sexo fetal. Por outro lado, as técnicas não invasivas por não apresentarem risco são amplamente utilizadas, sendo o método mais comum a determinação através da morfologia da genitália visualizada pelo ultra-som. No entanto, a acurácia do exame está diretamente relacionada com a precocidade de sua realização, sendo normalmente realizada com eficácia somente a partir do segundo trimestre (5). Mais recentemente, foram descritas inúmeras técnicas utilizando a reação da cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do DNA fetal na corrente sanguínea materna (1,2,3,4,5). Lo *et al*, (1997) mostraram a presença do DNA fetal no soro e plasma em concentrações muito maiores do que no sangue total materno. Em grávidas com período gestacional prematuro foram observadas concentrações do DNA fetal de 3 a 4% no plasma e 0,13% no soro (4). Esta descoberta possibilitou o desenvolvimento de diagnósticos pré-natais não invasivos, mas a análise somente se torna possível nos casos onde a sequência alvo está presente no feto, mas ausente na mãe como, por exemplo, na determinação do genótipo Rh D do feto para avaliação do risco da doença hemolítica do recém nascido (2). No presente estudo, foram desenhados novos iniciadores específicos para o cromossomo Y. A região alvo de amplificação escolhida se repete diversas vezes ao longo deste cromossomo, diminuindo a chance de falsos negativos e aumentando a capacidade de detecção devido ao maior número de sequências alvo por molécula de DNA do cromossomo Y.

O objetivo do trabalho foi verificar a sensibilidade e especificidade deste método em detectar o sexo fetal em amostras de gestantes e verificar a quantidade mínima necessária de DNA molde para a amplificação por PCR das sequências alvos no cromossomo Y.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletados cinco mililitros de sangue de 41 mulheres grávidas, em tubos EDTA K2 gel (PPT - Plasma Preparation Tube). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos e conservadas a 4°C até o momento da extração. O período gestacional variou entre 5 a 39 semanas. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Extração de DNA e PCR

O DNA genômico foi extraído do plasma utilizando o kit Charge Switch® (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de PCR constituiu em duas etapas (PCR Nested); a primeira, utilizando o conjunto de primer Cromoext F-CGCCTTGCTGAAAGAAAG e R-GTTCTGCCCTCAGTTCTTTCC e a segunda, reação o conjunto Cromoint F-CTTGGGAATTCTCTCTTGG e R-CTCA-TACTGGGGAATAAAG. As condições para as reações foram: Tampão 1X Taq Platinum® (Invitrogen) fornecido pelo fabricante, 0,5 µmol/ µl de cada primer, 2,5 mM de MgCl₂, 5 mM de dNTP e 1 unidade de Taq Platinum® (Invitrogen). O programa de amplificação iniciou com uma fase de desnaturação à 95°C por 7 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1,5 min, seguido da extensão final à 72°C por 7 min.

Recebido em

Aprovado em

*Instituto Hermes Pardini

Diluição seriada

O DNA genômico de um homem sadio foi extraído, quantificado e sua concentração foi ajustada para 100 ng/μl. Um microlitro desta solução foi diluída em um tubo contendo 9 microlitros de H₂O, essa operação foi repetida 7 vezes atingindo o fator de diluição de 1:10.000.000.

Padrão ouro

O padrão ouro utilizado nos experimentos foi o ultra-som morfológico confirmado duas vezes em datas diferentes.

RESULTADOS

No presente, estudo foram analisadas as amostras de plasma separado do sangue periférico de 41 gestantes. Todos os testes realizados nas amostras coletadas das gestantes foram confirmados pelo ultra-som (tabela I). O período gestacional de todas as gestantes está discriminado na tabela I. Após a análise dos resultados, foi estabelecida a especificidade de 100% e sensibilidade de 100% para o método testado.

Para verificar a quantidade mínima de DNA molde detectado por esta nova metodologia, as amostras diluídas foram submetidas à amplificação por PCR. Os resultados indicaram que a PCR foi capaz de detectar seqüências do cromossomo Y na amostra diluída 1:1.000.000, o que corresponde à 100 femtogramas de DNA (dados não mostrados).

TABELA I

Comparação dos resultados obtidos na determinação do sexo fetal pelo método da PCR e o ultrassom morfológico de 41 gestantes com período gestacional variando entre 5 a 39 semanas.

Gestante	Período gestacional	Resultado do ultrassom	Resultado do PCR
1	30 semanas	M	M
2	11 semanas	F	F
3	11 semanas	F	F
4	08 semanas	F	F
5	05 semanas	F	F
6	08 semanas	F	F
7	14 semanas	F	F
8	09 semanas	F	F
9	12 semanas	F	F
10	08 semanas	F	F
11	08 semanas	F	F
12	08 semanas	M	M
13	15 semanas	F	F
14	09 semanas	F	F
15	38 semanas	F	F
16	11 semanas	F	F
17	08 semanas	F	F
18	09 semanas	M	M
19	08 semanas	M	M
20	13 semanas	F	F
21	39 semanas	F	F
22	14 semanas	F	F
23	11 semanas	F	F
24	12 semanas	F	F
25	15 semanas	F	F
26	12 semanas	F	F
27	14 semanas	F	F
28	11 semanas	F	F
29	08 semanas	M	M
30	09 semanas	M	M
31	34 semanas	M	M
32	20 semanas	M	M
33	11 semanas	M	M
34	18 semanas	M	M
35	12 semanas	M	M
36	24 semanas	M	M
37	17 semanas	M	M
38	15 semanas	M	M
39	28 semanas	F	F
40	08 semanas	F	F
41	10 semanas	M	M

Comparação dos resultados obtidos na determinação do sexo fetal pelo método da PCR e o ultrassom morfológico de 41 gestantes com período gestacional variando entre 5 a 39 semanas.

DISCUSSÃO

Existem diversas técnicas já descritas para a determinação do sexo do feto através do sangue materno. No entanto, a técnica que desenvolvemos possui um grande diferencial que é o fato da região alvo de amplificação que se escolhem, trata-se de uma região bastante repetitiva no cromossomo Y e que aliado à técnica de PCR nested aumentou sua capacidade para detectar a presença deste cromossomo em proporções muito pequenas. A quantidade mínima de DNA molde, necessário para a detecção, estabelecido pelos testes, está 1.000.000 de vezes menor que a quantidade normalmente utilizada em reações padrões de PCR. Em todas as amostras testadas foi possível determinar com exatidão o sexo do feto. Dentre as 41 gestantes participantes do teste 36 ainda não tinham atingido o segundo trimestre de gestação quando realizaram o teste, e 25 ainda não tinham completado a 13ª semana de gravidez. A técnica se mostrou eficiente inclusive nos casos cujo período gestacional das participantes estava inferior ao recomendado por Tachdjian *et al*, (2002) para a determinação do sexo pelo ultra-som. A partir desses resultados, concluiu-se que a técnica desenvolvida foi eficiente na determinação do sexo fetal através do sangue materno.

REFERÊNCIAS

1. Dhallan, R.; Guo, X.; Emche, S.; Damewood, M.; Bayliss, P.; Cronin, M.; Barry, J.; Betz, J.; Franz, K.; Gold, K.; Vallecillo, B.; Varney, J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 10;369(9560):474-81, 2007.
2. Gonzalez-Gonzalez, C.; Garcia-Hoyos, M.; Trujillo-Tiebas, M.J.; Lorda-Sanchez, I.; de Alba, M.R.; Infantes, F.; Gallego, J.; Diaz-Recasens, J.; Ayuso, C.; Ramos, C.; Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem.* 53(3):307-14, 2005.
3. Honda, H.; Mihar, N.; Ohashi, Y.; Ohama, K.; Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 47 (1): 41-6, 2001.
4. Lo, Y.M.D.; Corbetta, N.; Chamberlain, P.F.; Rai, V.; Sargent, I.L.; Redman, C.W.; Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485-7, 1997
5. Tachdjian, G.; Frydman, N.; Audibert, F.; Ray, P.; Kerbrat, V.; Ernault, P.; Frydman, R.; Costa, J.M.; Clinical Applications of fetal sex determination in maternal blood in a preimplantation genetic diagnosis centre. *Human Reproduction* 17 (8): 2183-86, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Frederico Scott Varella Malta

Setor de Pesquisa & Desenvolvimento

Laboratório Hermes Pardini

R. Maranhão, 1040

CEP:30150-331 – BH- MG – Brasil

Tel:(31)3228-6768

E-mail: frederico@labhpardini.com.br; fredmalta78@yahoo.com.br

Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico

Isolation of *Candida* spp. of the oral mucus of patients submitted to the chemotherapeutical treatment

Débora Avrella¹ & Leticia Silveira Goulart²

RESUMO - A candidíase oral é uma doença oportunista que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. Entre os fatores responsáveis pelo aumento da prevalência de infecções por *Candida* spp., está a quimioterapia antineoplásica, que favorece a instalação de patógenos oportunistas, bem como a proliferação da microbiota, por causar um estado de comprometimento do sistema imune. Este trabalho teve como objetivos avaliar a frequência de *Candida* spp. em isolados da mucosa oral de pacientes submetidos à quimioterapia, além da identificação das espécies e atividade de fosfolipase. As amostras de swabs orais de 25 pacientes foram semeadas em ágar de Sabouraud dextrose, incubadas por 48 horas, a 37 °C, para posterior identificação por testes micológicos. Dez pacientes apresentaram leveduras do gênero *Candida* sendo todas *C. albicans* produtoras de fosfolipase. Possivelmente, os efeitos da quimioterapia estão relacionados com o aparecimento de infecções fúngicas nos pacientes analisados.

PALAVRAS-CHAVE - candidíase oral, quimioterapia, *Candida* spp.

SUMMARY - Oral candidiasis is an opportunist disease that catches overall immunocompromised individuals. Among the factors responsible for increase of *Candida* infection prevalence, the anticancer chemotherapy leads to opportunistic infections, as well as the proliferation of normal microbiota. This treatment cause a immune system compromise. The aims of this paper was evaluate the *Candida* spp. frequency in oral mucus isolated of chemotherapy treat patients, beyond the identification and phospholipase enzymatic activity. The oral swabs samples of 25 patients were inoculated in Sabouraud agar dextrose, maintained for 48 hours at 37°C to mycological tests. Ten patients had conferred leavenings of *Candida* spp., being all *C. albicans* phospholipase producers. Possibly, the chemotherapy effects are related with the appearance of fungal infections in the analyzed patients.

KEYWORDS - oral candidiasis, chemotherapy, *Candida* spp.

INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção fúngica de espectro bastante extenso, que acomete, principalmente, pacientes imunocomprometidos e apresenta como agente etiológico leveduras do gênero *Candida*. Apesar de ser um microrganismo sapróbio, *Candida* spp pode assumir uma forma patogênica frente a determinadas condições que comprometem o sistema imunológico. Dentre os fatores predisponentes para candidíase, destacam-se: diabetes mellitus, uso prolongado de antibióticos e corticóides, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), leucemia, queimaduras, transplantados e tratamento quimioterápico^{6, 10, 13, 14, 18, 33}. *Candida albicans* é a espécie mais frequente em infecções, sendo considerada o patógeno oportunista mais comum na espécie humana. Outras espécies também estão implicadas em quadros clínicos e têm apresentado uma elevada taxa de incidência, estas compreendem: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e mais recentemente, *C. dubliniensis*^{8, 16, 18, 19, 34}. A patogenicidade da *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, como capacidade de crescimento a 37°C, variabilidade fenotípica (*switching*), formação de hifas e pseudo-hifas, formação de biofilmes e presença de moléculas como um receptor homólogo a integrina CR3 humana, as quais facilitam a aderência às células epiteliais e habilidade de produzir enzimas hidrolíticas como as fosfolipases^{1, 2, 4, 5, 18, 21, 22, 27}. As manifestações clínicas da candidíase apresentam grande diversidade de quadros, podendo ser divididas em três grupos: mucocutânea, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucocutânea, os tecidos mais atingidos são os da mucosa oral e vaginal, sendo que a forma oral pode subdividir-se em cinco apresentações distintas: pseudomembranosa, atrófica aguda, hiperplásica crônica, queilite angular e língua negra pilosa^{12, 18, 30, 33}. Um dos fatores responsáveis pelo aumento da incidência de infecções causadas por *Candida* spp. é o tratamento de pacientes com câncer através de quimioterapia, o que leva a

um comprometimento do sistema imunológico. O tratamento quimioterápico facilita o aparecimento da levedura na cavidade bucal durante e após a terapia. A quimioterapia compreende o uso de substâncias citotóxicas no tratamento de neoplasias, estes fármacos interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares e têm como princípio a destruição de células tumorais malignas, porém também causam injúria às células normais provocando complicações variadas^{7, 9, 24, 32}. O tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. é limitado a um número pequeno de agentes antifúngicos, o que inclui polienicos como nistatina e anfotericina B; azólicos, entre eles o cetoconazol, itraconazol e fluconazol; e derivados azólicos recentes, como o voriconazol e o posaconazol^{27, 30, 33}. O presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, identificar a espécie dos isolados e avaliar a atividade da enzima fosfolipase das cepas.

MATERIAL E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Os pacientes foram caracterizados quanto ao tratamento utilizado, presença ou não de xerostomia e tipo de câncer.

PACIENTES

Foram coletados swabs da mucosa oral de 25 pacientes que realizaram quimioterapia no Hospital Santo Ângelo – RS. Os swabs foram armazenados em meio de transporte sob refrigeração (4°C) até o momento do cultivo. Os pacientes incluídos na pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo A) e foram informados sobre a finalidade da pesquisa, sendo garantida a privacidade e confidencialidade dos mesmos. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, sob protocolo nº 119-4/TCH/05.

Recebido em
Aprovado em

¹Graduanda do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. ²Responsável pela publicação: Professora Mestre do Curso de Farmácia, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões – URI.

ISOLAMENTO DE *CANDIDA* SPP. E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Os swabs orais foram semeados em placas de Petri contendo ágar de Sabouraud dextrose e incubados a 37°C. As colônias cremosas de coloração clara que cresceram sob o meio de cultura e, ao exame microscópico, apresentaram-se como blastoconídios foram caracterizadas como *Candida* spp. As amostras foram submetidas à determinação da espécie pela prova de formação do tubo germinativo e auxanograma com fonte de carbono³⁰.

ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE

A pesquisa de atividade de fosfolipase foi realizada em apenas 7 isolados, pois, três amostras apresentaram crescimento somente, no primo-isolamento, não sendo possível dar continuidade aos testes. As leveduras foram submetidas à pesquisa de produção de fosfolipase, segundo a técnica descrita por Price *et al.*²⁶. A leitura do teste foi realizada após 5 dias de incubação a 37 °C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Sendo os resultados apresentados em códigos: Pz = 1,0 (ausência de atividade enzimática), 0,64 < Pz < 1 (atividade enzimática positiva), Pz ≤ 0,63 (atividade enzimática fortemente positiva).

RESULTADOS

A partir da análise de 25 amostras de swabs orais de pacientes realizando quimioterapia foi possível isolar leveduras do gênero *Candida* de 10 pacientes, representando um índice de colonização de 40 %.

As características da população em estudo podem ser observadas através da análise da tabela abaixo (Tabela 1).

TABELA I
Caracterização da população estudada.

Paciente	Tratamento	Xerostomia	Tipo de Câncer	Presença de <i>Candida</i> spp.
01	Ácido Zoledrônico 4 mg	Sim	Mama	Sim
02	Pemetrexed dissolvido 700 mg	Sim	Pulmão	Sim
03	Pamidronato dissolvido 90 mg	Sim	Mama	Não
04	Citarabina 15 mg	Sim	Mielodisplasia	Não
05	Pamidronato dissolvido 90 mg	Não	Mama	Não
06	Doxorubicina 110 mg + Ciclofosfamida 1100 mg	Não	Mama	Não
07	Paclitaxel 270 mg	Sim	Mama	Não
08	Oxaliplatina + Leucovorin + Fluoruracil	Sim	Intestino	Sim
09	Fluoruracil 2 g	Não	Intestino	Sim
10	Gencitabina 1600 mg	Não	Bexiga	Não
11	Pamidronato dissolvido 90 mg	Sim	Próstata	Não
12	Docetaxel + Carboplatina + Trastuzumabe	Não	Mama	Não
13	Doxorubicina 110 mg + Ciclofosfamida 1100 mg	Não	Mama	Não
14	Fluoruracil 4 g + Oxaliplatina 140 mg + Leucovorin 600 mg	Não	Intestino	Não
15	Goserrelina 10 g	Não	Próstata	Não
16	Vinorelbina 40 mg + Gencitabina 1200 mg + Trastuzumabe 540 mg	Não	Mama	Não
17	Trastuzumabe 330 mg	Sim	Mama	Não
18	Trastuzumabe 440 mg + Fulvestrant 250 mg	Sim	Mama	Não
19	Leucovorin 35 mg + Fluoruracil 750 mg	Sim	Intestino	Não
20	Gencitabina 1200 mg + Vinorelbina 35 mg	Não	Pulmão	Sim
21	Pamidronato dissolvido 90 mg	Não	Mama	Sim
22	Oxaliplatina 170 mg + Leucovorin 400 mg + Fluoruracil 5,2 g	Sim	Intestino, pulmão e fígado	Sim
23	Pamidronato dissolvido 90 mg	Não	Bexiga	Sim
24	Ácido Zoledrônico 4 mg	Sim	Mama	Sim
25	Gencitabina + Vinorelbina	Não	Mama	Sim

Candida albicans predominou em 100 % dos isolamentos, não havendo assim presença de outras espécies. A pesquisa da atividade enzimática revelou que todos os isolados foram produtores de fosfolipases com índices de Pz variando entre 0,46 a 0,53 indicando alta atividade enzimática (Tabela 2).

TABELA II

Atividade de fosfolipase de isolados de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes sob tratamento quimioterápico.

Nº DO ISOLADO	ESPÉCIE	VALOR DE P _z
1	<i>Candida albicans</i>	0,50
2	<i>Candida albicans</i>	0,48
3	<i>Candida albicans</i>	0,53
4	<i>Candida albicans</i>	0,48
5	<i>Candida albicans</i>	0,46
6	<i>Candida albicans</i>	0,46
7	<i>Candida albicans</i>	0,46

DISCUSSÃO

Candida spp. é uma levedura comensal da cavidade oral, sua transformação a patógeno oportunista depende da combinação de alguns fatores relacionados ao hospedeiro, ao próprio fungo e a fatores que modifiquem o ambiente da cavidade oral³³.

A incidência de candidíase oral tem apresentado um significativo aumento e as razões para o estabelecimento são decorrentes da higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides, *diabetes mellitus*, queda da imunidade do hospedeiro e utilização de antineoplásicos³². No presente estudo, não foi observado uma correlação entre o isolamento de *Candida* spp. e o tipo de câncer, tratamento quimioterápico e presença ou não de xerostomia. Este resultado pode ser devido ao número de pacientes avaliados, e, ao fato, de que cada paciente utilizava um tratamento diferente, estudos futuros, englobando uma maior população pesquisada, devem ser realizados.

Neste estudo, verificou-se que 10 (40 %) dos pacientes apresentaram leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral. Em estudo realizado por Kignel *et al.*,¹¹ analisando aspectos fúngicos do câncer bucal, verificaram que dos 33 pacientes que participaram da pesquisa, 42,4 % foram positivos para *Candida* spp. Oliveira *et al.*,²³ avaliando a presença de *Candida* spp. em pacientes com câncer sob tratamento quimioterápico, evidenciaram uma frequência de 56,8 % de isolamento nestes pacientes. Moreira *et al.*²⁰ observaram a levedura em 47,3 % das amostras coletadas da cavidade oral de escolares. Martins *et al.*¹⁷, analisando a presença de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. na cavidade oral, encontraram a levedura em 61,22 % dos pacientes estudados. A quimioterapia promove a imunossupressão, pois age também nas células normais, comprometendo o sistema imune e a homeostasia salivar, predispondo assim a infecções pelo fungo na mucosa oral³². Em nosso trabalho, os pacientes poderiam estar com o sistema imunológico menos atuante devido quimioterapia, o que pode ter contribuído para a colonização pelas leveduras.

A candidíase oral pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida*. *C. albicans* é a mais frequente, seguida por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kruzei* e *C. parapsilosis*^{11, 17, 18, 25}. No presente estudo, todos os isolados foram caracterizados como *C. albicans*.

A frequência da espécie *C. albicans* na mucosa oral é bastante variada. Em estudo realizado por Penha *et al.*²⁵, os autores isolaram *Candida* spp. de 69 pacientes com estomatite protética e verificaram uma frequência de 81,1% de *C. albicans* nas amostras analisadas. Menezes *et al.*¹⁸ observaram que *C. albicans* compreendia 45% dos isolados de *Candida* spp. obtidas da mucosa bucal. Kignel *et al.*¹¹ encontraram índices mais baixos de isolamento desta espécie, sendo que *C. albicans* correspondeu 21% dos isolados estudados.

O gênero *Candida* produz diversos fatores de virulência. A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção, variando conforme a amostra. Essa enzima, localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua pela hidrólise dos fosfolípidos, dando origem aos lisofosfolípidos que causam dano à célula epitelial²⁶. Segundo Samaranayake *et al.*²⁸, entre as espécies de *Candida*, apenas *C. albicans* é capaz de produzir fosfolipase. Em nosso estudo, as amostras isoladas apresentaram-se fortemente produtoras de fosfolipase. Estes resultados são similares à literatura revisada. Estudos anteriores têm demonstrado que 30 a 100% das cepas de *C. albicans* são secretoras de fosfolipase, com graus variáveis de atividade^{26, 28, 29}.

Shimizu²⁹ verificou que 100% das cepas de *C. albicans* de seu estudo apresentavam atividade para fosfolipase. De acordo com Penha *et al.*²⁵, em um estudo sobre *Candida* spp. em pacientes desdentados totais, com e sem estomatite protética, a produção enzimática de fosfolipase esteve presente em 83,3% das amostras isoladas, sendo que 36,6% mostraram-se altamente produtivas. *Candido et al.*², avaliando a enzimatipagem de *Candida* isoladas da mucosa oral, observaram que 71,9% das cepas de *C. albicans* apresentaram atividade de fosfolipase. No estudo de Souza *et al.*³¹ este percentual atingiu 73,3% e Maffei¹⁵ verificou que 51,1% das cepas estudadas apresentavam esta enzima. A diversidade de resultados obtidos nos estudos que antecedem ao nosso podem ser explicados pela variedade das amostragens.

A candidíase oral é uma infecção fúngica emergente, a qual merece atenção no sentido de se reduzir as taxas de infecções, acelerar o diagnóstico e instituir a terapêutica correta. Para a adoção destas medidas é imprescindível o conhecimento da epidemiologia desta micose, bem como dos fatores predisponentes do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Rev. Odont. Un. São Paulo, v.13, n.4, p.343-348, 1999.
- CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzimatipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.33, n.5, p.437-442, 2000.
- COSTA, L. J.; BIRMAN, E. G.; ALVES, S. H.; CURY, A. E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of patients with cancer. Rev. Odont. Un. São Paulo, v.13, n.3, p.219-223, 1999.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- DOUGLAS, L.J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev. Iber. Micol., v.19, p.139-143, 2002.
- FERNANDES, A.T. et al. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde. São Paulo: Atheneu, 2000.
- FONSECA, S.M. & MACHADO, R.C.L. Manual de Quimioterapia Antineoplásica. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2000.
- FRIDKIN, S.K. & JARVIS, W.R. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. Clin. Micro. Reviews, v.9, n.14, p. 499-511, 1998.
- FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. São Paulo: Manole Ltda, 1999.
- KIGNEL, S. & BIRMAN, E.G. Aspectos fúngicos do câncer bucal. Rev. Bras. Canc., v.46, n.3, p.279-282, 2000.
- KONEMAN, E.N. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- LEUNG, K.W.; DASSANAYAKE, R.S.; YAU, J.Y.Y.; JIN, L.J.; YAM, W.C.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. J. Clin. Microbiol., v.38, n.6, p.2219-2226, 2000.

- LIMA, D.R. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicológica. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- MAFFEI, C.M.L. Amostras de *Candida albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica. São Paulo, 1996. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo.
- MARCO, F.; DANES, C.; ALMELA, M. Trends in frequency and in vitro susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. Results from a six-year study (1996-2001). Diag. Micro. Infect. Dis., v.46, n.4, p.259-264, 2003.
- MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.C.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presença de *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. Cienc. Odontol. Bras, v. 5, n. 3, p. 75-83, 2002.
- MENEZES, E.A.; CAVALCANTE, M.S.; FARIAS, R.B.; TEIXEIRA, A.B.; PINHEIRO, G.P.; BEZERRA, B.P.; TORRES, J.C.N.; CUNHA, F.A. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. J. Bras. Patol. Med. Lab., v.41, n.1, p.9-13, 2005.
- MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; MCCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., v.41, p.617-623, 1997.
- MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; RODRIGUES, J.A.O.; BORIOLLO, M.F.G.; PEREIRA, C.V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J.F. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba - SP, Brazil. Pesqui Odontol Bras, v. 15, n. 3, p. 187-195, 2001.
- NAGLIK, J.R.; NEWPORT, G.; WHITE, T.C. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect. and Immun., v.67, n.5, p. 2482-2490, 1999.
- NETO, M.M.; COSTA, R.S.; REIS, M.A.; GARCIA, T.M.P.; FERRAZ, A.S.; L.T.S.; BATISTA, M.E.P.N.; FIGUEIREDO, J.F.C. Candidíase em pacientes transplantados renais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.30, p.485-491, 1997.
- OLIVEIRA, E.E.; SILVA, S.C.; SOARES, A.J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M.R.R. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev Soc Bras Med Trop, v. 31, p. 523-527, 1998.
- OTTO, S.E. Oncologia. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2002.
- PENHA, S.S.; BIRMAN, E.G.; SILVEIRA, F.R.X.; PAULA, C.R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. Pesq Odont Bras, v. 14, n. 2, p.119-122, 2000.
- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia, v. 20, p. 7-14, 1982.
- QUINDÓS, G. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Rev. Iber. Micol., v.19, p.1-4, 2002.
- SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MACFARLAND, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia, v.22, p.201-207, 1984.
- SHIMIZU, M.T. Fosfolipase em espécies de *Candida*. Rev. Microbiol., v.20, p.338, 1989.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- SOUZA, E.M.B.; PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; CURY, A.E. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade à antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. Rev. Microbiol., v.21, p.247-253, 1990.
- SPOLIDÓRIO, D. M. P.; SPOLIDÓRIO, L.C.; BARBEIRO, R. H.; HÖFLING, J. F.; BERNARDO, W.L.C.; PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo mutans e *Candida* spp. e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos a radioterapia. Pesq. Odont. Bras, v.15, n.4, p.354-358, 2001.
- URIZAR, J.M.A. Candidíasis orales. Rev. Iber. Micol., v.19, p.17-21, 2002.
- WHITE, P.L.; WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SAMAD, S.A.; LEWIS, M.A.O.; BARNES, R. A. Detection of *Candida* in Concentrated Oral Rinse Cultures by Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol., v.42, n.5, p.2101-2107, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Leticia Silveira Goulart

Av. Universidade das Missões, 464/13203

CEP: 98802-470 Santo Ângelo, RS, Brasil.

E-mail: lgoulart@urisan.tche.br

Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres profissionais do sexo, Umuarama, Estado do Paraná*

Sexually transmitted diseases in female sex workers in Umuarama, Paraná State

Nelton Anderson Bespalez Correa¹; Francisco H. Matumoto² &

Maria Valdrinez Campana Lonardon³

RESUMO - Este estudo teve por objetivo estimar a frequência de DSTs e AIDS entre mulheres profissionais do sexo de Umuarama-Paraná e estudar as variáveis socioeconômicas e os fatores de risco para DSTs. O estudo foi descritivo e analítico com 75 profissionais do sexo em seus locais de trabalho, na cidade de Umuarama, Paraná, de outubro e dezembro de 2003. Foi aplicado um questionário estruturado e coletadas 75 amostras de sangue para a pesquisa de HIV, sífilis e AgHBs, além de 52 amostras de secreção vaginal para a pesquisa de *Candida* sp, *Trichomonas* sp e *Gardnerella vaginalis*. Uso de preservativos em todas as relações sexuais foi relatado por 61,3% das profissionais do sexo, uso de álcool por 94,7% e de tabaco por 66,7%, sendo que 16% consumiam a associação tabaco/maconha/cocaína. A escolaridade e a renda estavam associadas com a presença de DSTs. A prevalência de sífilis, HBsAg e anti-HIV foi de 2,7% cada, a de candidíase foi 23,1%, de vaginose 15,4% e de trichomoníase 3,9%. Os resultados apontam a necessidade de intervenção para reduzir a transmissão dessas DSTs, para garantir o acesso aos serviços públicos de saúde e de ações para a disseminação de informações entre as mulheres profissionais do sexo.

PALAVRAS-CHAVE - Prostituição; doenças sexualmente transmissíveis; mulheres profissionais do sexo.

SUMMARY - The aim of present study was to investigate the frequency of Sexually Transmitted Diseases (STD) and Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) in female sex workers from Umuarama, Paraná State, and the risk factors for Sexually Transmitted Diseases. The descriptive and analytic study included 75 sex workers in their work places, from October to December 2003. A structured questionnaire was applied, and 75 blood samples was collected for HIV, syphilis and AgHBs research. Fifty two samples of vaginal secretion was obtained for the search of *Candida* spp, *Trichomonas* spp and *Gardnerella vaginalis*. The use of Condom in all sexual intercourse, alcohol, tobacco and income were associated with the presence of STDs. The prevalence of syphilis, AgHBs and anti-HIV was 2.7% for each one, candidiasis 23.1%, bacterial vaginose 15.4% and trichomoniasis 3.9%. The results point to the need to intervention for reducing the transmission of these STDs and assure the access to the public health services, besides actions for the spread of information among female sex workers.

KEYWORDS - Prostitution; sexually transmitted diseases; sex workers women.

INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) são importante problema de saúde pública não somente pela morbidade da doença aguda, mas também porque delas resultam importantes seqüelas, como a facilitação da transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2003), além de consequências sociais e econômicas pois afetam as classes menos favorecidas da população. Mais de 340 milhões de pessoas contraem DSTs curáveis a cada ano no mundo e as mulheres apresentam maior vulnerabilidade a estas infecções (Kettler *et al*, 2004). No Brasil, o Ministério da Saúde considera que ocorrem cerca de 12 milhões de novos casos ao ano (Ministério da Saúde, 2006). A prostituição feminina é um dos ofícios mais remotos, mas ainda hoje estas mulheres sofrem discriminação e tem dificuldades de acesso aos sistemas de saúde e educação (Ministério da Saúde, 2002), o que as torna especialmente vulnerável às DSTs (Jackson *et al*, 1992; Rahman *et al*, 2000; Passos & Figueiredo, 2004).

Considera-se que as profissionais do sexo são mais suscetíveis às infecções por patógenos transmitidos sexualmente do que a população em geral, devido ao maior número de parceiros, ao não uso de preservativos (Passos & Figueiredo, 2004) e também a fatores como o baixo nível de conhecimento sobre as DSTs. Na Itália Trani *et al*, 2006, mostraram que embora a maioria das profissionais do sexo conhecesse a AIDS e a sífilis, o seu conhecimento sobre outras DST era insatisfatório. Já no Brasil, Fernandes *et al*,

2000, observaram que entre um grupo de mulheres atendidas na rede básica de saúde de Campina, São Paulo, 18% afirmaram nada saber a respeito da transmissão das DSTs. A falta de conhecimentos é agravada pelo fato de que as DST são geralmente assintomáticas e, com frequência, mesmo quando ocorrem sintomas dessas doenças, estes podem não despertar suspeitas. Dessa forma, aqueles que estão infectados podem inadvertidamente disseminar doenças por não saberem de sua condição. Estes dados são preocupantes porque as DSTs são responsáveis por problemas relacionados à diminuição da fertilidade entre homens e mulheres e neoplasias do colo do útero, vagina, vulva e pênis (Fernandes *et al*, 2000).

Se as mulheres com DSTs sofrem com o estigma moral e social que, muitas vezes, pode afastá-las de seu meio, dificultar o acesso aos serviços de saúde, tanto mais, as mulheres profissionais do sexo, se sentem à margem da sociedade e tem dificuldades em buscar orientações e atenção à sua saúde. O conhecimento da realidade destas mulheres é importante para orientar as ações em saúde e por isso, este estudo teve por objetivo estimar a frequência das principais DSTs e AIDS entre mulheres profissionais do sexo de Umuarama-Paraná, estudar os dados socioeconômicos e os fatores de risco em relação as DSTs nesta população.

METODOLOGIA

Desenvolveu-se estudo epidemiológico descritivo e analítico no período de outubro a dezembro de 2003, na cidade

Recebido em
Aprovado em

*Trabalho realizado na Universidade Paranaense (UNIPAR) Umuarama-PR e Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR

¹Mestrando em Análises Clínicas pelo Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá e professor do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama-PR.

²Departamento de Análises Clínicas da Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama-PR.

³Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR

de Umuarama, Estado do Paraná. Para a coleta dos dados, utilizou-se como referência a Organização Não Governamental (ONG) Grupo União pela Vida, que possui experiência na área de educação e de prevenção de doenças sexualmente transmissíveis e tem acesso às profissionais do sexo da cidade. Dados epidemiológicos de população com esse perfil se tornam um desafio, pois o serviço público não dispõe de um banco de dados com informações específicas e as ONGs são uma opção para a busca de dados para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos observacionais. Na primeira fase os pesquisadores visitaram os estabelecimentos e os pontos de prostituição feminina juntamente com membros da ONG, apresentando às mulheres os objetivos do projeto, prestando esclarecimentos e orientações. Na segunda fase, para as que concordaram em participar forneceu-se o termo de consentimento livre e esclarecido, com a garantia de sigilo e anonimato das informações, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A seguir, desenvolveu-se a entrevista com aplicação de um formulário estruturado e procedeu-se a coleta de material biológico para a realização de exames laboratoriais para doenças *essencialmente* transmitidas pelo contágio sexual, como a sífilis e a gonorréia e doenças *freqüentemente* transmitidas desse modo, como a candidíase, a trichomoníase, hepatite B e HIV; também foi pesquisada a ocorrência de vaginose bacteriana por *Gardnerella vaginalis*, considerando a sua *classificação etiológica*, entre as doenças bacterianas que podem ser transmitidas sexualmente (Azulay & Azulay, 2004). As variáveis estudadas foram: o nível de escolaridade, o tempo de serviço, a idade na primeira relação sexual, a utilização de drogas lícitas (álcool e tabaco) ou não (maconha, cocaína, crack), número de parceiros por semana e renda.

Foram contatadas 81 profissionais do sexo que atuavam em onze bares e três boates, sendo que uma recusou-se participar, alegando vergonha e cinco não apresentavam documentos de identificação pessoal. Em 75 mulheres foi realizada a coleta de sangue para a pesquisa de HIV, HBsAg e sífilis. Somente 52 delas concordaram em realizar a coleta de amostras de secreção vaginal para a pesquisa de trichomoníase, candidíase e vaginose bacteriana.

Os procedimentos para a entrevista e a coleta do material biológico foram feitos no próprio local de trabalho das mulheres, em ambiente reservado e após foram repassadas informações sobre os métodos recomendados para a prevenção, bem como a orientação sobre os aspectos clínicos e do tratamento, com vistas à melhoria da qualidade de vida. A pesquisa de anticorpos para os tipos 1 e 2 do HIV, foi realizada pelo método de microenzimaimunoensaio (MEIA - AxSYM-Abbott). Os casos positivos foram submetidos ao teste de imunofluorescência indireta e/ou Western Blotting, conforme a portaria 59 de 28 de janeiro de 2003 do Ministério da Saúde. O diagnóstico sorológico de sífilis foi realizado pelo método de floculação (VDRL, Laborclin) e os resultados positivos foram confirmados pelo método de Imunofluorescência indireta - FTA-Abs (BioMérieux). A pesquisa do antígeno de superfície (AgHBs) para o diagnóstico laboratorial de hepatite B foi realizada pelo teste de microenzimaimunoensaio (MEIA - AxSYM-Abbott) e os casos positivos foram repetidos pela mesma técnica e confirmados pelo teste de enzaimunoensaio Orgenics (Israel). A presença de *Trichomonas* sp, leveduras e *Gardnerella vaginalis* foi indicada pelo exame de secreção vaginal pelo

método a fresco e bacterioscopia (coloração de Gram). A vaginose bacteriana foi considerada quando foram atendidos pelo menos três dos seguintes critérios: presença de células alvo (*clue-cells*), pH vaginal >4,5, odor espontâneo de amina ou após adição de KOH a 10% ao fluido vaginal e corrimento leitoso e homogêneo. A presença de leveduras foi confirmada por cultura de material de secreção vaginal em meio de *Sabouraud* e identificadas ao nível de gênero e espécie (Morse *et al*, 1997). Todos os resultados foram encaminhados para o Serviço Público Municipal de Saúde de Umuarama (Coordenação Municipal de DST/AIDS) para posterior acompanhamento e tratamento, quando necessário.

Para a análise estatística utilizou-se o teste exato de Fisher bilateral e as associações foram avaliadas ao nível de 5% de significância. Foi usado o programa *Statistica* versão 6.0 (*Statsoft*).

RESULTADOS

Para a execução desta pesquisa foram visitados 11 bares e três boates, sendo incluídas no estudo 75 profissionais do sexo. A idade variou entre 18 e 54 anos (idade média de 28 anos), 68,0% eram solteiras e 55,0% não tinham filhos, entretanto 10,0% delas tinham três ou mais filhos. Detectou-se o uso de preservativos masculino pelo parceiro, em todas as relações sexuais, por 61,4% das profissionais do sexo, enquanto 39,6% deixavam de usar em algumas relações sexuais, por confiança no parceiro. O uso de bebidas alcoólicas foi observado em 94,7% das profissionais do sexo e o motivo alegado pela maioria delas estava relacionado à falta de perspectivas em relação à vida, à situação que elas julgavam se encontrar frente à sociedade e à busca de audácia para exercer o trabalho.

Das 75 profissionais do sexo, 50 (67,0%) eram usuárias de algum tipo de droga, lícita ou não, das quais 64,0% (32) consumiam somente tabaco e 36,0% faziam uso de outras drogas em associação com o tabaco, sendo a maior frequência (16,0%) para as que consumiam tabaco-cocaína-maconha. (Tabela 1). Não houve associação entre a ocorrência de DSTs e o uso de drogas lícitas (álcool e tabaco) ($p=1,00$) ou de drogas ilícitas (maconha e cocaína) ($p=0,89$). A análise da tabela 2 permite observar que 50,6% (38) das mulheres tinham menos de oito anos de escolaridade, havendo uma associação entre o nível de escolaridade e a ocorrência de DSTs ($p=0,006$). Embora a maioria das entrevistadas estivesse trabalhando a mais de um ano (62,6%), não houve associação entre tempo em serviço e a ocorrência de DSTs ($p=0,32$). Da mesma forma, a idade na primeira relação sexual ($p=0,62$) e o número de parceiros por semana ($p=0,20$) não foram associados com a ocorrência de DSTs. A maioria das profissionais do sexo (65,3%) tinha rendimentos de até 400 dólares (cerca de R\$1.200,00) havendo associação entre a baixa renda e a ocorrência de DSTs ($p=0,05$).

Entre as 75 mulheres nas quais foi possível a realização de exames sorológicos, observou-se que 24 (32,0%) apresentavam alguma das DSTs estudadas, sendo que 2 (2,7%) foram positivas para HIV, 2 (2,7%) para sífilis e 2 (2,7%) para hepatite B (Tabela 3). Entre as 52 amostras de secreção vaginal, 2 (3,8%) foram positivas para trichomoníase e 12 para candidíase (23,1%). Vaginose bacteriana foi diagnosticada em 8 (15,4%) mulheres. Uma das mulheres tinha sorologia positiva para o AgHBs e também candidíase, outra apresentava a associação sífilis, candidíase, trichomoníase e uma terceira tinha infecção por *Candida* sp. e vaginose bacteriana.

TABELA I

Tipo de drogas e suas associações utilizadas por mulheres profissionais do sexo, de outubro a dezembro de 2003, no município de Umuarama, Estado do Paraná.

Tipo de droga	Nº de usuárias	%
Cigarro	32	64
Cigarro+Maconha	4	8
Cigarro+Cocaína	3	6
Cigarro+Crack	2	4
Cigarro+Cocaína+Maconha	8	16
Cigarro+ Cocaína+Crack	1	2
Total	50	100

TABELA II

Ocorrência de DSTs/AIDS e nível de escolaridade, tempo de serviço, idade da primeira relação sexual, uso de drogas, número de parceiros e renda no trabalho, entre 75 mulheres profissionais do sexo, de outubro a dezembro de 2003, no município de Umuarama, Estado do Paraná.

Categorias e variáveis	Presença de DST/AIDS		Total	p*
	Sim	Não		
Nível de escolaridade				
Menos de 8 anos	18	20	38	0,006
8 anos ou mais	06	31	37	
Tempo em serviço				
Menos de 8 anos	11	17	28	0,32
8 anos ou mais	13	34	47	
Idade na primeira relação sexual				
De 11 a 15 anos	15	28	43	0,62
Mais de 15 anos	09	23	32	
Uso de drogas				
Sim	16	34	50	1,00
Não	08	17	25	
Número de parceiros por semana				
Até 8 parceiros	13	36	49	0,20
Mais de 8 parceiros	11	15	26	
Renda do trabalho				
Até 400 dólares	23	39	49	0,05
Mais de 400 dólares	01	12	26	
Total	24	51	75	

p*: teste exato de Fisher.

TABELA III

Frequência de DSTs entre mulheres profissionais do sexo, no período de outubro a dezembro de 2003, no município de Umuarama, Estado do Paraná.

DST	Nº/total	%
HIV	2/75	2,7
Sífilis	2/75	2,7
AgHBs	2/75	2,7
Trichomoníase	2/52	3,8
Candidíase	12/52	23,1
Vaginose bacteriana	8/52	15,4

DISCUSSÃO

Nesta investigação foram estudadas profissionais do sexo feminino na faixa etária de 18 a 54 anos da cidade de Umuarama, Estado do Paraná. Os pesquisadores, orientados por uma ONG, procuraram visitar todos os locais de trabalho do grupo estudado e foram feitos esforços adicionais no sentido de identificar todos os estabelecimentos onde trabalhavam profissionais do sexo.

Os achados mostraram que o número de mulheres que utilizam preservativos (61,3%) não diferiu daquele encontrado por Paiva *et al*, 2002, entre a população feminina em geral (63%). Por outro lado, também existem estudos, como o conduzido por Camejo *et al*, 2003, na Venezuela, mostrando graus ainda menores (42,7%) de adesão ao uso de preservativos entre trabalhadoras do sexo. Isso indica que as profissionais do sexo não adotam medidas de prevenção mais consistentes que outras mulheres. Silveira *et al*, 2005, encontraram, entre a população feminina da cidade de Pelotas, RS, Brasil, que 28% das mulheres estudadas relataram o uso de preservativo na última relação sexual e que o grupo mais vulnerável a DST/AIDS, devido ao não uso de preservativo, era o de mulheres brancas, adultas em uniões estáveis e com menos parceiros sexuais. Segundo Jiménez *et al*, 2001, o principal fator preditivo para o não uso de preservativo é a existência de um parceiro fixo. O envolvimento afetivo e o grau de confiança podem levar este grupo de mulheres a valorizar menos as medidas de prevenção. A busca de afetividade nos relacionamentos, seja com o companheiro, namorado ou cliente fixo foi mencionada por Simon *et al*, 2002, como entre as contradições que agem como possíveis fatores impeditivos para adoção de comportamentos preventivos consistentes.

O alto consumo de álcool entre as profissionais do sexo chamou a atenção (94,7%) e isso pode estar relacionado a inúmeros fatores, destacando-se o mencionado por elas próprias, como a necessidade de estimular o consumo de álcool pelo cliente, como uma forma de obter maiores lucros para elas ou para seus agenciadores. Simon *et al*, 2002, observaram que, dentre 13 profissionais do sexo investigadas em Ribeirão Preto, São Paulo, 12 usavam álcool, alegando a mesma necessidade de induzir o parceiro a consumir mais. Embora Pechansky *et al*, 2005, não tenham observado associação entre uso eventual de drogas e a soropositividade para HIV entre prostitutas, Passos & Figueiredo, 2004, encontraram na exposição a bebidas alcoólicas o fator de risco para DSTs mais frequente entre prostitutas. O consumo de álcool também tem sido referido como associado a sintomas depressivos (Schreiner *et al*, 2004).

Além do álcool, outras drogas lícitas ou não, fazem parte da vida das profissionais do sexo. Dentre estas destacam-se o tabaco, consumido por 64% delas e a associação tabaco-maconha-cocaína, usada por 16%. Tran *et al*, 2005, observaram que no Vietnã 38% das mulheres profissionais do sexo usavam drogas, das quais 32% drogas injetáveis. Destaca-se o estudo realizado por Lopes *et al*, 2001, que encontrou que 60,1% de mulheres presidiárias em São Paulo, Brasil, faziam uso de maconha, 36% de crack e 86% de tabaco. Por outro lado, Simon *et al*, 2002, observaram que as profissionais do sexo consideram o controle no uso de álcool e de outras substâncias psicoativas um aspecto fundamental para o seu trabalho. Neste estudo, chamou a atenção o consumo de cigarro em associação com outras drogas ilícitas, que alcançou 36% das mulheres.

A educação é outra variável de relevância, havendo uma proporção maior de profissionais do sexo que tinham DSTs

entre aquelas com menor nível de escolaridade, indicando que o grau de instrução é importante para a maior conscientização sobre essas doenças, formas de transmissão e prevenção. Dados semelhantes foram observados Camejo *et al*, 2003, que detectaram associação entre o baixo nível educacional e a ocorrência de DSTs. Por outro lado, estudo realizado por Carret *et al*, 2004, em Pelotas, RS, Brasil, mostrou que mesmo entre a população em geral a escolaridade teve uma associação inversa com sintomas de DST, sendo que as pessoas com um a quatro anos de escolaridade apresentaram 50% mais sintomas de DST do que aquelas com 12 anos ou mais. São também relevantes os dados de Bastos & Szwarcwald, 2000, mostrando que no Brasil incidência da AIDS em mulheres foi 53% maior entre aquelas com menor escolaridade. O nível educacional pode estar relacionado a um melhor entendimento das medidas de prevenção e uma maior capacidade de colocá-las em prática, como observado por Fornasa *et al*, 2005, na Itália, que encontraram que o uso de preservativos foi maior entre as profissionais do sexo com maior nível educacional, mostrando que a adoção de medidas preventiva está associada ao maior nível educacional.

Neste estudo observou-se uma menor ocorrência de DSTs entre as profissionais com maiores rendimentos financeiros. Por outro lado, não se detectou associação entre o tempo em serviço, o número de parceiros por semana, a idade da primeira relação sexual e a ocorrência de DSTs. A idade na primeira relação sexual foi semelhante à encontrada por Camejo *et al*, 2003, em estudo com profissionais do sexo realizado na Venezuela.

No presente estudo observou-se que 32% das profissionais do sexo apresentavam alguma das DSTs estudadas, enquanto na Índia, Desai *et al*, 2003, detectaram que 47,5% de profissionais do sexo estudadas apresentavam testes laboratoriais para DSTs, excluídos aqueles para HIV, positivos. Embora estes dados não se prestem a fazer inferências para o estado do Paraná ou para o país como um todo, permitem estabelecer estimativas da sua elevada frequência e, tal como outros estudos já realizados no país (Carret *et al*, 2004; Passos & Figueiredo, 2004; Taquette *et al*, 2004; Codes *et al*, 2006; Jiménez *et al*, 2001), confirmam que as DSTs são um importante problema de saúde pública no Brasil.

No Brasil em 1995, um estudo com 600 trabalhadoras do sexo, realizado nas cidades de Santos, Campinas e São Paulo, apontou 11% de infecção pelo HIV (Lurie *et al*, 1995), um índice alto em relação aos encontrados no presente estudo (2,66%). Por outro lado, Montano *et al*, 2005, detectou uma prevalência de 1,2% de infecção por HIV entre mulheres trabalhadoras do sexo num estudo envolvendo nove países da América do Sul. Em algumas regiões do mundo, a prevalência da infecção pelo HIV é muito elevada, como em KwaZulu-Natal, África do Sul, que alcançou 50,3% (Ramjee *et al*, 1998), ou na Índia onde foi detectada em 43,2% das trabalhadoras do sexo (Desai *et al*, 2003). Em Pápua Nova Guiné (Mgonr *et al*, 2002), entre 407 trabalhadoras do sexo de cidades portuárias a prevalência foi de 10% para HIV, destacando-se que 85% delas relataram não usar preservativo em todas as relações sexuais e por motivos semelhantes aos citados no presente trabalho, como o pedido do parceiro, a confiança no cliente e o uso de álcool. Por outro lado, estudos realizados no Japão (Miyazaki *et al*, 2002) e em Lima (Trujillo *et al*, 1999), Peru, com a mesma população alvo, não detectaram nenhum caso de HIV positivo, enquanto na Austrália, O'Connor *et al*, 1996, apontaram apenas 0,46% de casos de HIV.

A positividade para sífilis (2,7%) foi inferior a encontrada

em outros estudos realizados no Brasil, como os de Lurie *et al*, 1995, que assinalaram 45% de casos de sífilis, e de Codes *et al*, 2006, que na periferia de Salvador-Bahia, encontraram na população feminina 5,1% de positividade para sífilis. Com a mesma população alvo, em Lima no Peru, Trujillo *et al*, 1999, encontraram 3,1% de casos positivos para sífilis e Uribe *et al*, 1997, na cidade do México observaram uma prevalência de 6,4%. Índices muito superiores forma observados na Austrália (10%) (O'Connors *et al*, 1996) e na Índia (22,7%) (Desai *et al*, 2003). Estes dados indicam que embora as medidas preventivas sejam universais, as características de cada país, região ou cidade devem ser conhecidas e analisadas, para que medidas de controle efetivas possam ser adotadas.

Neste trabalho a positividade de AgHBs (2,7%) foi superior a encontrada por Bertolini, 2002, no Estado do Paraná, em estudo de prevalência realizado com gestantes. Embora os dados deste trabalho mostrem percentuais inferiores aos obtidos por Tanaka, 2000, que estimou a prevalência nacional desta doença em 7,9%, eles indicam que as profissionais do sexo aqui avaliadas estão expostas ao vírus da hepatite B e que medidas específicas para o diagnóstico e a prevenção devam ser consideradas. Entre outros estudos realizados com profissionais do sexo, os dados deste trabalho contrastam com os obtidos por Lurie *et al*, 1995, no Brasil, que encontraram 39% de positividade para hepatite B. Entretanto não difere significativamente dos estudos realizados por Camejo *et al*, 2003, na Venezuela que encontraram positividade de 3,8% para o AgHBs, embora no Japão Miyazaki *et al*, 2002, não encontraram nenhum caso de AgHBs.

Nesta investigação foi observada uma positividade de 23,1% para candidíase, 15,4% para vaginose bacteriana e 3,8% para trichomoníase. Em pacientes ambulatoriais Adad *et al*, 2001, encontraram resultados semelhantes com prevalências para candidíase de 22,5%, *Gardnerella vaginalis* 15,9% e trichomoníase 3,4%. Entre trabalhadoras do sexo de cidades portuárias, na Pápua Nova Guiné (Mgonr *et al*, 2002), foi encontrada prevalência de 33% para trichomoníase. Ainda entre profissionais do sexo, na África do Sul foram encontradas prevalências de 40,6% para *Candida albicans*, 71% para vaginose bacteriana e de 41,3% para trichomoníase (Ramjee *et al*, 1998). A ocorrência de vaginose bacteriana entre as profissionais do sexo investigadas foi semelhante a da população em geral, como observado no estudo realizado por Simões-Barbosa *et al*, 2002, que encontraram 33% de casos entre mulheres atendidas num Centro de Saúde em Brasília, DF, mas foi inferior a de outros estudos conduzidos com profissionais do sexo, como o de Giraldo *et al* (2005), que encontrou 41,5% casos de vaginose entre profissionais do sexo.

Durante a execução desta investigação foi observado que muitas das profissionais do sexo faziam uso diário de ducha higiênica como medida preventiva para DSTs. Essa prática está inserida na sua rotina diária, embasada em crenças populares fortemente arraigadas e de difícil mudança. Embora Giraldo *et al*, 2005, não tenham encontrado associação entre o uso de ducha higiênicas e distúrbios da flora vaginal, esse hábito poderia alterar as condições fisiológicas do trato genital feminino levando a mudanças na microbiota vaginal de modo que favoreça a ocorrência de determinadas DSTs. Por outro lado o uso de ducha higiênica pode também mascarar o diagnóstico laboratorial, dificultando a identificação de microrganismos cuja detecção dependa do cultivo ou da pesquisa direta.

Os dados obtidos neste estudo indicam a necessidade de intervenção para reduzir a transmissão das DSTs e garan-

tir às profissionais do sexo o acesso aos serviços públicos de saúde e às informações sobre a prevenção. Os programas de educação e prevenção de DSTs para esse grupo social devem levar em conta a percepção de risco destas mulheres e o seu grau de entendimento, pois a importância do cuidado que elas conferem a própria saúde e que medidas tomam para preservá-la, dependem quase que exclusivamente de padrões socioeconômicos, hábitos e crenças relacionadas com a cultura das profissionais do sexo. Também é necessário criar espaços para a discussão e reflexão, de modo a clarificar as crenças e concepções que ainda fazem parte do imaginário social desse segmento sobre as DSTs/AIDS (Simon *et al*, 2002), especialmente nos envolvimento afetivos que são percebidos como relacionamentos seguros, dispensando a negociação de práticas preventivas. Por outro lado, é necessário que os profissionais de saúde recebam um treinamento adequado para o contato com essa população, buscando conhecer o seu comportamento, tomando ciência da sua maneira de agir, sentir, pensar e do contexto onde se insere esse grupo social.

REFERÊNCIAS

- Adad, S.J.; Lima, R.V.; Sawan, Z.T.E. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. São Paulo Med J, São Paulo, 119: 200-205, 2001.
- Azulay, M.M.; Azulay, D.R. Doenças sexualmente transmissíveis. In: Azulay, R. D., Azulay, D.R. organizadores. Dermatologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 255-272, 2004.
- Bastos, F.; Szwarcwald, C. AIDS and pauperization: principal concepts and empirical evidence. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16: 65-76, 2000.
- Bertolini, D.A. Estudo da prevalência do vírus da hepatite B e dos seus genótipos no Estado do Paraná, Brasil. (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.
- Camejo, M.I.; Mata, G.; Diaz, M. Prevalence of hepatitis B, hepatitis C and syphilis in female sex workers in Venezuela. Rev Saúde Pública, São Paulo, 37: 339-344, 2003.
- Carret, M.L.V.; Fassa, A.G.; Silveira, N.D.S.; Bertoldi, A.D.; Hallal, P.C.. Sexually transmitted diseases symptoms in adults: prevalence and risk factors. Rev Saúde Pública, São Paulo, 38: 76-84, 2004.
- Codes, J.S.; Cohen, D.A.; Melo, N.A.; Teixeira, G.G.; Leal, A.S.; Silva, T.J.; Oliveira, M.P.R. Screening of sexually transmitted diseases in clinical and non-clinical settings in Salvador, Bahia, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22: 225-234, 2006.
- Desai, V.K.; Kosambiya, J.K.; Thakor, H.G.; Umrigar, D.D.; Khandwala, B.R.; Bhuyan, K.K. Prevalence of sexually transmitted infections and performance of STI syndromes against aetiological diagnosis, in female sex workers of red light area in Surat, India. Sex Transm Infect, 79: 111-115, 2003.
- Fernandes, M.A.S.; Antonia, D.G.; Bahamondes, L.G.; Cupertino, C.V. Conhecimentos, atitudes e práticas de mulheres brasileiras atendida pela rede básica de saúde com relação às doenças de transmissão sexual. Cad de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16: 103-102, 2000.
- Fornasa, C.V.; Gai, F.; Tarantello, M.; and Gallina, P. Knowledge of sexually transmitted diseases and condom use among female street sex workers in Padua. Acta Dermatoven APA, 14: 107-110, 2005.
- Giraldo, P.C.; Amaral, R.L.G.; Gonçalves, A.K.; Vicentini, R.; Martins, C.H.; Giraldo, H.; Fachini, A.M. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal. Rev Bras Ginecol Obstet, 27: 257-262, 2005.
- Jackson, L.; Highcrest, A.; Coates, R.A. Varied potential risks of HIV infection among prostitutes. Soc Sci Med, 35:281-286, 1992.
- Jiménez, A.L.; Gottlieb, S.L.D.; Hardy, E.; Zaneveld, J.L.D. Prevention of sexually transmitted diseases among women: association with socioeconomic and demographic variables. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17: 55-62, 2001.
- Kettler, H.; White, K.; Hawkers, M. Mapping the landscape of diagnostic for sexually transmitted infections. (document TDR/STI/DE/04.1) Geneve, Switzerland, 2004.
- Lopes, F.; Latorre, M.R.D.O.; Pignatari, A.C.C. HIV, HPV, and syphilis prevalence in a women's penitentiary in the city of São Paulo, 1997-1998. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17: 1473-1480, 2001.
- Lurie, P.; Fernandes, M.E.; Hughes, V.; Arevalo, E.I.; Hudes, E.S.; Reingold, A.; Hearst, N. Socioeconomic status and risk of HIV-1, syphilis and hepatitis B infection among sex workers in Sao Paulo State, Brazil. Instituto Adolfo Lutz Study Group. AIDS, (Suppl. 1): 31-37, 1995.
- Mgonr, C.S.; Passey, M.E.; Anang, J.; Peter, W.; Lupiwa, T.; Russel, D.M.; Babona, D.; Alpers.M.P. Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted infections among female sex workers in two major cities in Papua New Guinea. Sex Transm Dis, 29: 265-270, 2002.
- Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em (www.aids.gov.br/final/dados/dst.htm, acesso em 15 Nov. 2006).
- Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Profissionais do sexo: documento referencial para ações de prevenção das DST e da AIDS. Brasília: Ministério da Saúde; Brasil. 2002.
- Miyazaki, M.; Takagi, S.; Kato, M.; Une, H. Prevalences of and risk factors for sexually transmitted diseases among Japanese female commercial sex workers in middle and high-class soaplands in Japan. Int J STD AIDS, 13: 833-838, 2002.
- Montano, S.M.; Laguna-Torres, A.; Cuchi, P.; Ávila, M.; Weissenbacher, M.; Serra, M. Prevalences, Genotypes, and Risk Factors for HIV transmission in South América. J Acquir Immune Defic Syndr, 40: 57-64, 2005.
- Morse, A.S.; Adele, A.; Moreland, E.; Holmes, K.K. Atlas de doenças sexualmente transmissíveis e AIDS. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; 1997.
- O'Connor, C.C.; Berry, G.; Rohrsheim, R.; Donovan, B. Sexual health and use of condoms among local and international sex workers in Sydney. Genitourin Med, 72: 47-51, 1996.
- Paiva, V.; Latorre, M.R.; Gravato, N.; Lacerda, R. Sexuality of women living with HIV/AIDS in São Paulo. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 18: 1609-1620, 2002.
- Passos, A.D.C.; Figueiredo, J.F.C. Fatores de risco para doenças sexualmente transmissíveis entre prostitutas e travestis de Ribeirão Preto (SP), Brasil. Rev Panam Salud Publica, 16: 95-101, 2004.
- Pechansky, F.; Diemen, L.; Kessler, F.; De Boni, R.; Surra, H.; Inciardi, J. Predictors of HIV seropositive status in non-IV drug users at testing and counseling centers in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21: 266-274, 2005.
- Rahman, M.; Alam, A.; Nessa, K.; Hossain, A.; Nahar, S.; Datta, D.; Alam, K.S.; Amin, R.; Albert, M.J.I. Etiology of sexually transmitted infections among street-based female sex workers in Dhaka-Bangladesh. J Clin Microbiol, 38: 1244-1246, 2000.
- Ramjee G, Karim SS, Sturm AW. Sexually transmitted infections among sex workers in KwaZulu-Natal, South Africa. Sex Transm Dis, 25: 346-349, 1998.
- Schreiner, L.; Silva, Jr C.L.; Paim, L.L.; Baú, M.C.; Ramos, F.; Cardinal, T.M.; Cunha Filho, E.V.; Furtado, N.R.; Martins, D.M.; Picon, P. Prevalência de sintomas depressivos em uma amostra de prostitutas de Porto Alegre. Rev Psiqiatr RS, 26: 13-20, 2004.
- Silveira, M.F.; Santos, I.S.; Béria, J.U.; Horta, B.L.; Tomasi, E.; Victora, C.G. factors associated with condom use in women from na urban area in southern Brazil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21: 1557-1564, 2005.
- Simões-Barbosa, A.; Feijó, G.C.; Silva, J.X.; Leal, I.I.R.; Barbosa, T.W.P. A Six-Year Follow-up Survey of Sexually Transmitted Diseases in Brasília, the Capital of Brazil. Brazilian J Infect Dis, 6: 110-117, 2002.
- Simon, C.P.; Silva, R.C.; Paiva, V. Female juvenile prostitution and AIDS prevention programs in Brazil. Rev Saúde Pública, 36: 82-87, 2002.
- Tanaka, J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. Vaccine, 18: S17, 2000.
- Taquette, S.R.; Vilhena, M.M.; Paula, M.C. Doenças sexualmente transmissíveis e gênero: um estudo transversal com adolescentes no Rio de Janeiro. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 20: 282-290, 2004.
- Tran, T.N.; Detels, R.; Long, H.T.; Phung, V.; Lan, H.P. HIV Infection and Risk Characteristics Among Female Sex Workers in Hanoi, Vietnam. J Acquir Immune Defic Syndr, 39: 581-586, 2005.
- Trani, F.; Altomare, C.; Nobili, C.G.A.; Angelillo, I.F. Female sex street workers and sexually transmitted infections: their knowledge and behaviour in Italy. J Infect, 52: 269-275, 2006.
- Trujillo, L.; Muñoz, D.; Gotuzzo, E.; Yi, A.; Watts, D.M. Sexual practices and prevalence of HIV, HTLV-I/II, and Treponema pallidum among clandestine female sex workers in Lima, Peru. Sex Trans Dis, 26: 115-118, 1999.
- Uribe-Salas, F.; Hernandez-Avila, M.; Conde-Gonzalez, C.J.; Juarez-Figueroa, L.; Allen, B.; Anaya-Ocampo, R. Low prevalences of HIV infection and sexually transmitted disease among female commercial sex workers in Mexico City. Am J Public Health, 87: 1012-1015, 1997.
- World Health Organization. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Maria Valdrinez Campana Lonardoni.
Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Análises Clínicas
Avenida Colombo, 5790, Bloco J-90 Sala 2.
CEP. 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil.
E-mail: mvclonardoni@uem.br

Câncer do colo do útero: influência da adequação da amostra cervical no resultado do exame citopatológico*

Uterus cancer: influence of the suitability of the cervical sample on the result citopatológico test

Nair Pereira Dean Ramos¹; Joaquina de Araújo Amorim² & Carlos Eduardo de Queiroz Lima³

RESUMO - O exame citopatológico é o método mais usado para rastrear o câncer do colo do útero. Sua qualidade depende da amostra cervical coletada. Visando a contribuir com a otimização do laudo citopatológico, observou-se a influência da adequação da amostra cervical em 3.931 laudos, com o intuito de diminuir a incidência de falso-negativos. O estudo foi documental, retrospectivo, comparativo e analítico. As amostras foram coletadas em mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde – Campina Grande-PB e enviadas ao Citolab (Laboratório de Citologia e Análises Clínicas Ltda.) no período de janeiro a dezembro de 2002. Os dados obtidos foram agrupados e avaliados de acordo com variáveis relacionadas às informações contidas nas requisições e respectivos laudos citopatológicos. Os resultados permitiram detectar que a maioria dos casos positivos foram encontrados nas amostras satisfatórias. Mostrando assim, que a adequação da amostra cervical influencia no resultado do laudo citopatológico, que a Unidade de Saúde “E” teve o maior número de amostras satisfatórias e de casos positivos, e que a Unidade “D” coletou o maior número de amostras satisfatórias mas limitadas.

PALAVRAS-CHAVE - Câncer do colo do útero, Amostra Cervical, Adequação, Citopatológico.

SUMMARY - The citopatologic test is the most used method to detect uterus cancer. Its quality depends on the quality of the collected cervical sample. Aiming to contribute to the optimization of the quality of citopatologic brief, the influence of the adaptation of cervical sample in 3.931 briefs was observed, with the objective of reducing the incidence of false-negatives. The study was documental, retrospective, comparative and analytic. The samples were collected from women assisted at the Health Basic Units – Campina Grande – PB and sent to Citolab (Laboratório de Citologia e Análises Clínicas Ltda.) from January to December 2002. The obtained data were gathered and evaluated according to variables related to information contained in requirements and respective citopatologic briefs. The results allowed to detect that most of the positive cases were found in the satisfactory samples. Showing, thus, that the suiting of the cervical sample has an influence on the result of the citopatologic brief; that the Health Unit “E” had the largest number of satisfactory samples and positive cases, and that Unit “D” collected the largest number of satisfactory but limited samples.

KEYWORDS - Uterus cancer, Cervical Sample, Suiting, Citopatologic.

INTRODUÇÃO

Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países do mundo a introduzir a citologia de Papanicolaou para a detecção precoce do câncer de colo de útero, esta doença persiste em ser um sério problema de saúde pública, uma vez que este tipo de câncer ocupa o 3º lugar em incidência e o quarto em mortalidade em todo o Brasil⁵.

O câncer do colo do útero se desenvolve a partir de transformações intra-epiteliais não malignas progressivas que podem evoluir para uma lesão invasora, num período de 10 a 20 anos⁴. A evolução dessa patologia, na maioria dos casos, se dá de forma lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis⁴. O exame citopatológico (Papanicolaou) é o método mais adequado e usado para detectar as lesões precocemente e rastrear o câncer do colo do útero. Executado, periodicamente, é uma importante estratégia na redução das taxas de morbidade e mortalidade desta doença⁹.

Apesar do exame citopatológico ter uma sensibilidade e especificidade em torno de 80% e ser o método mais utilizado, a quantidade de falso-negativos varia de 2 a 62%. Esses 62% são em decorrência de erros na coleta de material e 38% são atribuídos a erros de escrutínio ou de interpretação do diagnóstico¹⁵. Dentre os erros mais cometidos na obtenção da amostra, o mais verificado é a ausência de componentes endocervicais e da zona de transformação, junção escamo-colunar (JEC). Nesses locais, ocorrem a

maioria dos cânceres cervicais¹¹. Por isso, a coleta que não atinge a junção escamo-colunar (JEC) e endocérvice, diminui as chances de se detectarem as lesões precursoras e o câncer cervical. Outras causas também podem interferir na adequação da amostra como: sangue e polimorfonucleares em excesso, dessecamento, áreas espessas, entre outros⁴. Visando a corroborar com a otimização da qualidade do laudo citopatológico, realizou-se o levantamento de 3.931 requisições e respectivos laudos citopatológicos, de mulheres submetidas ao exame pelas Unidades Básicas de Saúde, de Campina Grande-PB, no período de janeiro a dezembro de 2002 e enviadas ao Citolab (Laboratório de Citologia e Análises Clínicas Ltda.), com o intuito de observar a adequação da amostra cervical coletada por essas Unidades; correlacionar a adequação da amostra cervical com os casos positivos (Atipias de Significado Indeterminado em Células Escamosas – ASC-US e ASC-H, Atipias de Significado Indeterminado em Células Glandulares – AGUS, Neoplasia Intraepitelial Cervical – NICs I, II, III/Ca in situ, Carcinoma e Papilomavirus humano – HPV) e verificar se a adequação da amostra cervical influencia no resultado do exame citopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi do tipo documental, retrospectivo, comparativo e analítico.

Recebido em

Aprovado em

*Este artigo é baseado na dissertação com o mesmo título apresentada pela autora Nair Pereira Dean Ramos à Universidade Estadual da Paraíba, no ano de 2006, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Coletiva.

Av. das Baraúnas, S/N, Campus Universitário, Bodocongo, Campina Grande – PB. Local de realização da pesquisa: CITOLAB – Laboratório de Citologia e Análises Clínicas, Rua Treze de Maio, 31, Sala 04, Centro, Campina Grande-PB.

¹Autora responsável. M.Sc; Prof^a. Ministrante da Disciplina Citologia Oncótica e Hormonal na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Farmácia, Rua Juvêncio Arruda, S/N, Campus Universitário, Bodocongo, Campina Grande – PB. Endereço residencial: Rua Joaquim José do Vale, 416, Jardim Tavares, Campina Grande, PB, Brasil, Telefones: (83) 3322 4510 e 3322 2757, e-mail: nairdean@yahoo.com.br.

²M.D.; Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Odontologia, Rua Juvêncio Arruda, S/N, Campus Universitário, Bodocongo, Campina Grande – PB.

³PhD. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife – PE

A população estudada foi composta por 15.000 mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde, que se submeteram ao exame citopatológico do colo do útero, durante o ano de 2002, em dez Unidades Básicas de Saúde de Campina Grande-PB e enviadas ao Citolab (Laboratório de Citologia de Análises Clínicas).

A amostra foi composta por 3.931 requisições e seus respectivos laudos citopatológicos. Dessas, 17 foram consideradas insatisfatórias para a avaliação citológica. Estudou-se, então, 3.914 requisições e seus respectivos laudos, com o nível de confiança de 95% e erro permitido de 1,55% para mais ou para menos.

Os dados foram agrupados sob a forma de quadros, tabelas e gráficos, empregando-se o Programa Estatístico SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences- for Windows) e a Planilha eletrônica Excel e foram avaliados de acordo com as variáveis: idade, escolaridade, dados da anamnese, dados do exame clínico, adequabilidade da amostra cervical e laudo citopatológico (Segundo os critérios adotados pelo Ministério da Saúde em 2002).

Como instrumento de pesquisa foram utilizados os formulários fornecidos e padronizados pelo Ministério da Saúde, com campos para serem registrados dados de identificação pessoal e clínicos e no verso, o diagnóstico citológico padronizado, baseado nas classificações Richart e Bethesda 1991. No tratamento estatístico, foram utilizados o Cruzamento e aplicação do teste qui-quadrado para verificação da significância ou não da correlação entre a adequação da amostra cervical e o resultado dos exames citopatológicos; para isso foram criadas as seguintes hipóteses:

H0: A adequação da amostra cervical não influencia no resultado do exame citopatológico.

H1: A adequação da amostra cervical influencia no resultado do exame citopatológico.

Aplicou-se o teste qui-quadrado e encontrou-se p-valor < 0,05, logo foi rejeitada H0 e aceitou-se H1 ou seja a adequação da amostra influencia no resultado do exame citopatológico.

A Secretária Municipal de Saúde de Campina Grande autorizou o acesso às informações contidas nas requisições e respectivos laudos, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê Ético em Pesquisa da UEPB em 30/11/2006.

RESULTADOS

Os dados coletados nas 3.914 requisições e respectivos laudos, foram analisados quanto à faixa etária das mulheres estudadas, verificando-se que a maioria, 58,5%, tinham de 21 a 40 anos de idade.

Quanto ao nível de escolaridade, observou-se que prevaleceu o percentual (41,03%), de mulheres com o 1º grau incompleto. Dentre as 3.914 requisições, apenas 596 continham a anamnese, observando-se que 91,28% usavam anticoncepcional. Na inspeção do colo das 3.914 mulheres, percebeu-se que 55,98% tinham o colo normal e 28,97% o colo alterado.

Nas requisições estudadas, observou-se que o intervalo de tempo da última coleta de material para o exame citopatológico na maioria das mulheres (21,60%) foi de 1 ano.

Dos laudos citopatológicos analisados, verificou-se que a flora microbiológica das amostras cervicais eram constituídas por: 82,45%, de bacilos; 52,22%, de cocos; 27,64%, de lactobacilos; 6,67%, de *Gardnerella vaginalis*; 5,0%, de *Cândida spp*; e 3,58%, de *Trichomonas vaginalis*.

Foram analisados 3.931 laudos citopatológicos quanto à adequação das amostras, dessas, 17 (0,43%) foram classificados como insatisfatórias para a avaliação citológica; 2.944 (74,90%) satisfatórias e 970 (24,67%) satisfatórias mas limitadas. Dentre as amostras com limitações 661 (16,81%), prevaleceu a ausência de células endocervicais (Tabela 1).

Analysaram-se 3.914 laudos citopatológicos, os quais foram classificados como: 90,90% com alterações reativas ou reativas benignas; 0,87% dentro dos limites da normalidade e 8,23%, de casos positivos (ASC-US e ASC-H, AGUS, NIC I, NIC II, NIC III/Ca in situ e HPV) (Tabela 2).

Correlacionando Unidades Básicas de Saúde, adequação da amostra cervical e laudos citopatológicos positivos, verificou-se que os casos positivos foram mais detectados nas amostras satisfatórias com um percentual de 7,18%, que nas amostras satisfatórias mas limitadas com apenas 1,05% (Tabela 3).

Analysando a adequação da amostra cervical para o exame citopatológico em relação às Unidades Básicas de Saúde, observou-se que a Unidade "E", coletou o maior número (678) de amostras "satisfatórias" e a Unidade "D" a maioria (321) das amostras "satisfatórias mas limitadas" (Tabela 3). Quanto à relação entre os casos positivos e as Unidades Básicas de Saúde, verificou-se que o maior percentual (2,3%) de casos positivos foram detectados nas amostras cervicais coletadas pela Unidade "E" (Tabela 3).

TABELA I

Distribuição percentual das amostras cervicais para o exame citopatológico, estudadas segundo a sua adequabilidade, de mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde – Campina Grande – PB, 2002.

Adequabilidade do material	
Satisfatórias	
Satisfatórias mas limitadas por presença de sangue	
Satisfatórias mas limitadas por purulento	
Satisfatórias mas limitadas por áreas espessas	
Satisfatórias mas limitadas por dessecamento	
Satisfatórias mas limitadas por ausência de células endocervicais	
Satisfatórias mas limitadas por outras causas	
Insatisfatórias	
TOTAL	

TABELA II

Distribuição percentual dos laudos citopatológicos de mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde – Campina Grande – PB, 2002.

Laudos	n	%
Dentro dos limites da Normalidade	34	0,87
Alter. cels. Benignas	3.558	90,90
ASCUS	169	4,32
NIC I	29	0,74
NICI P/NIC II	6	0,15
NIC II	10	0,25
NIC II / NIC III	1	0,03
NIC III / Ca in situ	5	0,13
ASC-US, ASC-H/AGUS	24	0,61
NIC I C/ HPV	13	0,33
AGUS	55	1,40
NIC I C/ AGUS	1	0,03
NIC I C/ AGUS HPV	1	0,03
NIC II C/ HPV	2	0,05
NIC II C/ AGUS	3	0,08
NIC III C/ AGUS	3	0,08
TOTAL	3.914	100

TABELA III

Distribuição percentual das amostras cervicais coletadas em mulheres, atendidas nas Unidades Básicas de Saúde, segundo a adequação da amostra e laudos positivos por Unidade Básica de Saúde. Campina Grande, 2002.

UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE	Adequação da Amostra X Laudo Positivo								
	Satisfatória			Satisfatória mas limitada			Insatisfatória		
	N	posit.	%	n	posit.	%	total	n	%
Unidade A	193	15	0,38	40	4	0,10	233	1	0,02
Unidade B	328	31	0,79	111	8	0,20	439	9	0,23
Unidade C	284	29	0,74	67	8	0,20	351	1	0,02
Unidade D	443	25	0,64	321	5	0,13	764	5	0,14
Unidade E	678	90	2,3	116	12	0,31	794	0	0
Unidade F	46	2	0,05	9	0	0	55	0	0
Unidade G	468	33	0,84	129	1	0,03	597	1	0,02
Unidade H	169	16	0,41	83	2	0,05	252	0	0
Unidade I	134	17	0,44	29	0	0	163	0	0
Unidade J	201	23	0,59	65	1	0,03	266	0	0
TOTAL	2944	281	7,18	970	41	1,05	3.914	17	0,43

DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero tem maior probabilidade de afetar mulheres entre 30 e 40 anos de idade, principalmente aquelas submetidas aos fatores de risco, dentre os quais: baixo nível de escolaridade e sócio econômico; uso prolongado de contraceptivos orais; papilomavirus humano, entre outros⁸. Nesse estudo, verificou-se que a maioria das mulheres que se submeteram ao exame citopatológico tinham de 21 a 40 anos de idade (58,5%), mostrando dessa forma, que estas mulheres estão sujeitas a esse fator de risco.

Alguns estudos na América Latina, desenvolvidos por Rodrigues Salvia¹⁹, notificou que o risco de mulheres serem acometidas por câncer cervical aumenta em relação inversa ao número de anos estudados. O nível de escolaridade mais freqüente nessa pesquisa foi o 1º grau incompleto em 41,03% das mulheres estudadas.

A pílula anticoncepcional e os hormônios da gravidez promovem hiperplasia polipóide e ectopia do epitélio colunar endocervical, que estão sujeitos aos fenômenos metaplásicos, importantes no surgimento das modificações celulares iniciais dos processos neoplásicos cervicais¹. Observou-se que, em apenas 596 requisições, foram informados os dados da anamnese, e dessas 91,28%, usavam anticoncepcional.

O intervalo de tempo entre as coletas de amostras cervicais para o exame citopatológico, neste estudo, para a maioria das mulheres (21,6%), foi de um ano. Esta constatação é louvável, pois, sabe-se que a eficácia do rastreamento do câncer do colo do útero, aumenta quando o intervalo entre as coletas diminui¹⁰. Nesta pesquisa, também, se observa que 13,9% das mulheres estavam se submetendo ao exame citopatológico pela primeira vez. Essas mulheres estão mais sujeitas ao risco de serem acometidas pelo câncer cervical que as que se submetem ao rastreamento, anualmente.

As infecções locais, provocadas por agentes biológicos como bacilos, *Candidas* sp. e *Trichomonas vaginalis*, podem potencializar a ação do Papilomavirus humano (HPV), promovendo condições ideais para que o vírus se instale nas camadas basais do epitélio escamoso do colo do útero³. Nesta pesquisa, muitos desses agentes biológicos estavam presentes na flora vaginal, principalmente bacilos, em 82,45%, das mulheres estudadas.

Freitas *et al*¹⁴ esclareceram que a junção escamo-colunar (JEC) é o local de encontro entre os epitélios escamoso e

colunar. Chamou-se de zona de transformação normal, a qual assume um significado particular nos processos neoplásicos do colo do útero; portanto, locais anatômicos onde ocorre a maioria dos cânceres cervicais¹¹. A zona de transformação é constituída por células escamosas e endocervicais. É nesse local onde ocorre o fenômeno de metaplasia, estimulado pelo pH vaginal. Se essa metaplasia for motivada pelo papilomavirus (HPV) resulta numa zona de transformação anormal, podendo iniciar-se o processo neoplásico²². Por isso, a amostragem dos componentes endocervicais e/ou metaplásicos é tão importante. A ausência desses componentes diminui as chances de se detectarem as lesões precursoras e o câncer do colo do útero. Neste estudo, observou-se que 2.944 amostras estudadas (74,90%), foram "satisfatórias".

A amostra satisfatória, mas limitada, pode não conter dados clínicos (idade, data da última menstruação, informações adicionais quando apropriadas); conter sangue; inflamação; áreas espessas; artefatos de dessecação; comprometendo de 50 a 75% das células epiteliais; prejudicando, parcialmente, a interpretação da amostra e ausência de componentes da zona de transformação⁴. Dos laudos pesquisados, observou-se que 970 (24,67%) tinham amostras "satisfatórias mas limitadas". Dentre essas, destacou-se a ausência de células endocervicais e/ou componente da zona de transformação, com 661 amostras (16,81%).

A amostra "insatisfatória" indica que não é adequada para avaliação citológica e que uma nova coleta deve ser realizada¹⁶. O material não é confiável para a detecção de anormalidades epiteliais cervicais. A escassez de componente epitelial escamoso, bem preservado e visualizado, isto é, menos de 10% da superfície da lâmina; a ausência de identificação da usuária na lâmina; lâmina quebrada que não possa ser reparada; má fixação; sangue em demasia; inflamação; áreas espessas em mais de 75% das células epiteliais, impedindo a interpretação da amostra, caracterizam a sua inadequação. Nesse estudo, foram encontradas 17 (0,43%) de amostras "insatisfatórias". Para esses exames citopatológicos, foram sugeridos repetir a coleta. Isto quando ocorre, é incômodo para a mulher, visto que onera o Sistema Único de Saúde com gastos desnecessários, quando poderiam ser evitados com uma coleta adequada. Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países a introduzir a citologia de Papanicolaou, para a detecção precoce do câncer do colo do útero, esta doença persiste em ser um sério problema de saúde pública, uma vez que este tipo de câncer ocupa o 3º lugar em incidência e o 4º em mortalidade em todo o Brasil⁵.

Para o Brasil, em 2006, esperava-se 19.260 novos casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 20 casos para 100 mil mulheres. O Nordeste é o 2º mais incidente, com 17 casos para 100 mil mulheres⁶. Na Paraíba, em 2005, foram encontrados 12 casos de adenocarcinomas; 59 carcinomas epidermóides invasivos; 613 lesões intra-epiteliais de alto grau e 1.585 lesões intra-epiteliais de baixo grau¹⁷. Em Campina Grande, no ano de 2005, foram detectados através do exame Papanicolaou: 188 lesões intra-epiteliais de alto grau (incluindo câncer do colo do útero) e 1.277 lesões intra-epiteliais de baixo grau (incluindo HPV e atipias de significado indeterminado)⁷.

Nos 3.914 laudos analisados, foram encontrados: 169 atipias de significado indeterminado em células escamosas; 55 atipias de significado indeterminado em células glandulares; 24 atipias de significado indeterminado em células escamosas e em células glandulares; 50 NIC I; 16 NIC II; 8 NIC III/Ca in situ e em 16 dessas atipias citadas foram de-

tectados efeitos citopáticos compatíveis com HPV. Estudos demonstram que cerca de 90% dos tumores malignos e lesões precursoras do câncer do colo do útero contêm o material genético de alguns tipos de papilomavirus humano (HPV), reforçando o seu papel na indução destas neoplasias²³. Estudo de coorte reconstituída demonstra que, entre as mulheres com alta carga de HPV 16, o risco de evoluir para NIC III é mais elevado quando comparados com mulheres nas quais o HPV 16 não foi detectado²⁴.

Fox¹³ relatou a progressão de displasia leve (NIC I) para displasia moderada (NIC II) ocorrida em 60% dos casos estudados num período de 10 anos. Dessas, 30% foi observada taxa de regressão dessas lesões. Richart; Barron¹⁸ realizando um acompanhamento de 557 mulheres com NICs de vários graus, estimou que mais de 6% delas poderiam progredir para câncer dentro de 10 anos.

Embora o método de Papanicolaou seja o mais utilizado para detectar lesões precursoras e o câncer do colo do útero, o mesmo vem sofrendo uma série de críticas devido à alta proporção de resultados falso-negativos, que variam de 2% a 62%¹⁵. Esses autores observaram que 62% desses falso-negativos foram devidos a erros na coleta do material cervical e 38% foram atribuídos a erros de escrutínio ou de interpretação do laudo. Dentre os erros na coleta, o mais encontrado é a ausência de células endocervicais e/ou metaplásicas no esfregaço.

Estudos como os de Shirata *et al*²¹, Eleutério *et al*¹², Silva *et al*²⁰ evidenciaram que as limitações como áreas espessas, dessecamento, esfregaços purulentos e, principalmente, a ausência de componentes endocervicais e/ou da zona de transformação, comprometeram a qualidade das amostras cervicais. Este estudo mostrou que os casos positivos têm mais chances de serem detectados em amostras satisfatórias (adequadas) que em amostras satisfatórias mas limitadas. Pois, do total de casos positivos em 3.914 laudos pesquisados, 322 (8,23%), 281 (7,18%) foram detectados em amostras satisfatórias e apenas 41 (1,05%) em amostras satisfatórias, mas limitadas. A hipótese levantada de que a adequação da amostra influencia no resultado do exame citopatológico foi comprovada através do teste qui-quadrado onde p valor foi < 0,05.

Verificou-se que a Unidade Básica de Saúde "E" apresentou o maior número de amostras (678) coletadas corretamente, isto é, satisfatórias e, conseqüentemente, foi encontrado o maior percentual de casos positivos (2,3%) e a Unidade Básica de Saúde "D" foi a que menos coletou adequadamente, com 321 amostras satisfatórias mas limitadas. Isto implica a participação de profissionais envolvidos com a coleta de material para o exame citopatológico, nos programas de educação continuada, aprimoramento individuais e teste de proficiência ser de fundamental importância². Enfim, os objetivos deste trabalho, de classificar as amostras e laudos, correlacionando os casos positivos com adequação da amostra e as Unidades Básicas de Saúde, avaliando a coleta cervical para o exame citopatológico nessas Unidades foram alcançados.

REFERÊNCIAS

1. Abrão FS, Abrão MS. Aspectos atuais do tratamento do câncer do colo do útero. *Go Atual* 1992; 2: 21-26.
2. ASC. American Society of Cytopathology – Cervical Cytology Practice Guidelines. *Acta Cytol* 2001; 45: 201 - 6.
3. Aurelian L. Viruses and Carcinoma of the Cervix. (Switzerland), 1991. *Contrib. Gynecology Obstet.* 1991; 18: 54-70.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Cartilha de Atualização em Diagnóstico de

Lesões do Colo do Útero - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e Mama – Viva Mulher, 2001, p. 17-18.

5. Brasil. Ministério da Saúde. INCA. Coordenação de Programas de Controle de Câncer: Pro-Onco. Rio de Janeiro, 2003.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2006. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.
7. Campina Grande. Prefeitura Municipal. Secretaria de Saúde do Município. Programa de Controle do Câncer do Colo do Útero, 2006.
8. Ceará, Secretaria de Saúde. Guia para prestação de serviços em saúde reprodutiva. Fortaleza: Viva Mulher. Governo do Estado do Ceará e Secretaria de Saúde do Estado, 1998, p. 432.
9. Cesar J. et al. Fatores associados à não realização de exame citopatológico de colo uterino no extremo Sul do Brasil. (Rio de Janeiro), 2003. *Caderno de Saúde Pública* 2003; 19(5): 1365-1372.
10. Clarke EA, Anderson TW. Does screening by "Pap" smears help prevent cervical cancer? A case-control study. *Lancet* 1979; 2: 1-4.
11. Dewar MA, Hall K, Perchalski J. Cervical cancer screening. Past success and future challeng. *Cancer Epid Prev Screen* 1992; 19(3): 589-603.
12. Eleutério Júnior J. et al. Esfregaços endocervicais por escova: avaliação citológica e correlações clínico-colposcópica. *Rev Bras Analises Clínicas* 2001; 33(4): 175-178.
13. Fox CH. Biological behavior of dysplasia and carcinoma in situ; *Am J Obstet Gynecol* 1967; 99: 960-8.
14. Freitas F. et al. e cols. Rotina em Ginecologia. Porto Alegre; Arte Médicas; 1997. p.186-213.
15. Gay JD, Donaldson LD, Goellner JR. False-negative results in cervical cytology studies. *Acta Cytol* 1985; 29: 1043 -6.
16. McKee GT. Citopatologia. São Paulo; Artes Médicas; 2001. p. 14, 36-38.
17. Paraíba. Secretaria de Saúde do Estado. Informações Estatísticas de janeiro/ 2005 a janeiro/2006. Disponível em: www.data.sus.gov.br. [2006 ago 01].
18. Richart RM. Follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105: 386-92.
19. Rodrigues SA. Fatores de risco del cancer de cerviz en el municipio Cerro. *Rev Cuba Higiene Epidemiol* 1999; 37: 40-46.
20. Silva HA, Silveira LMS, Corrêa PBF, Souza MGT. A Influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colpocitológico. *Rev Brasileira de Análise Clínicas* 2002; 34(3): 131-135.
21. Shirata NK. et al. Celularidade dos esfregaços cervico-vaginais: importância em programas de garantias de qualidades em citopatologia. *J Bras Ginecol* 1998; 108: 63-6.
22. Spitzer M, Krumholz BA. Human papillomavirus-related diseases in the female patient. (Philadelphia), 1992. *Urologic Clinics of North America* 1992; 19:71-82.
23. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Res* 1997; 71:321-41.
24. Ylitalo N. et al. Consistest high viral load of human papillomaavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case control study. *Lancet.* 2000; 355(9222): 2194-8.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prevalência de anemia nas gestantes atendidas em Unidades de Saúde em Feira de Santana, Bahia, entre outubro de 2005 e março de 2006

Prevalence of anemia in pregnant women attended by the Health Care Units in the municipality of Feira de Santana within the period between October 2005 and March 2006

Pedro Nascimento Prates Santos¹ & Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira²

RESUMO - Deficiências nutricionais e conseqüente anemia constituem importantes problemas de Saúde Pública, tendo sido incrementadas nas duas últimas décadas ações de saúde e políticas públicas objetivando sua prevenção e tratamento (WHO; UNCF; UNU, 2001). A anemia é uma alteração caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina em relação aos valores referenciais. Durante a gravidez a deficiência de ferro pode estar associada a múltiplas adversidades tanto para mãe como para o feto, incluindo aumento do risco de hemorragia, sepsis, mortalidade materna, mortalidade peri-natal e baixo peso ao nascer (WHO; UNCF; UNU, 2001). O presente estudo objetivou estimar a prevalência de anemia nas gestantes atendidas em Unidades de Saúde no município de Feira de Santana, no Estado da Bahia – Brasil, no período compreendido entre outubro de 2005 e março de 2006, bem como descrever as principais características sociais, econômicas, demográficas e ginecológico-obstétricas, associados ao desenvolvimento de anemia na gestação. Inicialmente foi realizado estudo de prevalência, descritivo. A amostra utilizada foi representativa das gestantes atendidas em Unidades de Saúde do município de Feira de Santana, no período entre outubro de 2005 a março de 2006. Foi utilizado formulário estruturado contendo blocos de questões relacionadas com os dados pessoais; informações sociodemográficas e socioeconômicas; dados ginecológicos e obstétricos. Os dados hematológicos foram obtidos em um laboratório de análises clínicas que presta serviço ao Sistema Único de Saúde (SUS). A análise descritiva demonstrou prevalência de 31,9% de anemia entre as gestantes entrevistadas. Os resultados obtidos apontam para a necessidade de intervenções no sentido de minimizar os determinantes da anemia objetivando a redução da freqüência deste agravo na população.

PALAVRAS-CHAVE - Anemia, gestação, prevalência, fatores de risco.

SUMMARY - Nutritional deficiencies and consequent anemia constitute important Public Health problems. Health initiatives and public policies, with the object of preventing and treating these problems, have increasingly been developed in the last two decades (WHO; UNCF; UNU, 2001). Anemia is a disorder characterized by a reduction in the concentration of hemoglobin compared to reference levels. During pregnancy iron deficiency can be associated with multiple problems for both the mother and fetus, including heightened risk of hemorrhage, sepsis, maternal mortality, perinatal mortality and low birth weight (WHO; UNCF; UNU, 2001). The object of this work was to estimate the prevalence of anemia in pregnant women attended by the Health Care Units in the municipality of Feira de Santana within the period between October 2005 and March 2006 also to characterize the sociodemographic, socioeconomic and gynecological-obstetrical factors associated with the development of anemia in the pregnant women. A descriptive prevalence study was undertaken. The research included a representative study group of pregnant women attended by the Family Health Care Units in the municipality of Feira de Santana within the period between October 2005 and March 2006. A questionnaire containing question blocks related to personal details, sociodemographic and socioeconomic information, gynecologic and obstetric history. Hematologic results were obtained from a testing laboratory that provides services to the Brazilian Health System (SUS) in Feira de Santana. A descriptive analysis demonstrated prevalence of 31,9% of anemia among the interviewed pregnant women. The results obtained point to the need to intervene in order to minimize the causes of anemia, with the objective of reducing the frequency of this injury in the general population.

KEYWORDS - Anaemia, pregnancy, prevalence, risk factors.

INTRODUÇÃO

A anemia é uma alteração caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina em relação aos valores referenciais. Pode ser decorrente da diminuição na produção de hemácias, à prematura destruição, ou à diminuição crônica do volume de sangue por hemorragias. As conseqüências da anemia dependem do grau de diminuição da concentração da hemoglobina, manifestando-se nas formas mais brandas pela diminuição da sensação de bem-estar e da resistência à fadiga, afetando, assim, a capacidade de trabalho, e nas formas mais graves por alterações do comportamento psicológico e inaptidão física que podem culminar com insuficiência respiratória e colapso do organismo (WHO; MHC; MSM, 1992).

A anemia é um dos agravos mais freqüentes causada por deficiência nutricional no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO; MHC, 1992). Os grupos mais afetados em ordem decrescente são as mulheres grávidas, os pré-escolares, crianças que nasceram com baixo peso,

mulheres adultas, idosos, crianças em idade escolar e homens adultos.

As gestantes constituem um dos grupos mais vulneráveis à ocorrência de anemia devido ao grande requerimento de micronutrientes neste período. Se a ingestão dietética for insuficiente e se os estoques de nutrientes da mãe estiverem baixos, o feto precisará recorrer às reservas pré-concepcionais para se suprir, ocorrendo comprometimento do binômio materno-fetal. De forma geral, a diminuição na ingestão de micronutrientes pode provocar alterações dos mecanismos maternos de adaptação à gravidez. Percebe-se que durante a gestação, se houver uma boa nutrição, é provável que os bebês nasçam mais saudáveis, já que um bom estado nutricional materno proporciona um bom desenvolvimento intra-uterino.

No Brasil, segundo Santos (2002b), apenas dois estudos enfocando a prevalência de anemia em mulheres, com amostras representativas, foram realizados entre 1990 e 2000, ambos na região nordeste: o estudo do Instituto Nacional

Recebido em

Aprovado em

¹Professor do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana

²Professora do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana

de Alimentação e Nutrição (INAN, 1998) e o estudo promovido pelo Governo do Piauí em parceria com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ; UNICEF, 1992). Os resultados de ambos foram muito semelhantes, apontando valores em torno de 25%. Existe, portanto, para a população brasileira carência de dados sobre a prevalência de anemia. Em estudo realizado por Arruda (1997), incluindo gestantes de uma maternidade pública, foram detectados 30,9% casos de anemia. Entre as mulheres anêmicas apenas 1% delas apresentaram deficiência de ácido fólico.

A gravidez na adolescência vem a ser uma situação de risco, pois a mulher nesta fase, comumente negligencia aspectos importantes da sua saúde (GALLETTA, 1997). Segundo Rodriges (1998) a anemia afeta cerca de 40% das gestantes no terceiro trimestre de gravidez em Cuba, sendo a causa principal o fator alimentar. Avaliação realizada por Labrada (2000) evidenciou que a difícil situação econômica que atravessa este país tem levado a modificação do estado nutricional de alguns grupos populacionais, destacando-se entre eles o das mulheres grávidas por se constituírem em grupo bastante vulnerável.

O presente estudo objetivou estimar a prevalência de anemia nas gestantes atendidas nas Unidades de Saúde da Família no município de Feira de Santana, no Estado da Bahia - Brasil, no período compreendido entre outubro de 2005 e março de 2006, bem como descrever as principais características sociais, econômicas, demográficas e ginecológico-obstétricas, associados ao desenvolvimento de anemia na gestação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado Estudo piloto no mês de setembro de 2005 para testar a adequação dos procedimentos a serem adotados, objetivando otimização dos instrumentos de pesquisa. Foi realizado levantamento censitário das gestantes através do Sistema de Informação à Atenção Básica (SIAB), SMS e DATASUS neste período para fins de cálculo do tamanho da amostra do projeto.

O estudo aplicado para mensuração da prevalência de anemia em gestantes foi do tipo descritivo, de corte transversal e observacional. Os dados relativos à determinação da prevalência de anemia foram obtidos no período compreendido entre outubro de 2005 e março de 2006, em um laboratório de análises clínicas da rede privada do município e que atende, entre outras, às gestantes das Unidades de Saúde da Família, em Feira de Santana.

A metodologia utilizada para seleção, na população de gestantes, da amostra analisada foi do tipo aleatória simples. Calculado o tamanho da amostra para a população de $N = 1533$ gestantes, onde esta população é finita (ARMINDA, 2001), considerando a margem de erro de 4,0% e intervalo de confiança de 95%, partindo de uma prevalência conhecida de 22,4% de acordo com o estudo piloto e estudos semelhantes no Brasil especialmente na Região Nordeste, chegou-se ao tamanho da amostra de aproximadamente $n = 326$ gestantes.

Foram excluídas deste estudo as gestantes ou seus responsáveis legais que se recusaram a: 1) participar da pesquisa após o esclarecimento sobre seus objetivos; 2) assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; 3) aceitar que seus dados clínicos e laboratoriais fossem utilizados e; 4) responder ao formulário da pesquisa.

A coleta de dados relativa à caracterização das gestantes foi realizada através de dois instrumentos: aplicação de formulário (dados primários) e cartão da gestante (dados secundários) buscando através deles a obtenção de informações pessoais, dados sociais, econômicos, demográficos e ginecológico-obstétricos. A disponibilidade das informações contidas no Cartão das Gestantes possibilitou, ao lado da aplicação do formulário, a composição de uma base de dados individualizada para cada gestante da população sob estudo.

As coletas e análises sangüíneas foram realizadas em um único laboratório prestador de serviços de análises clínicas credenciado pelo SUS/Feira de Santana, que atende gestantes assistidas nas Unidades de Saúde da Família do município.

A coleta sangüínea foi realizada com seringa estéril e descartável, mediante punção venosa na flexura do cotovelo, feita assepsia prévia da pele com álcool a 70%. O sangue, após transferência para tubos de ensaio contendo duas gotas de anticoagulante (EDTA) e com a identificação da gestante, foi homogeneizado cuidadosamente para não ocasionar hemólise. A seguir, a amostra coletada foi acondicionada em local adequado até análise.

A análise hematológica (Hemograma) foi realizada em equipamentos automatizados, calibrados diariamente. Os aparelhos realizam a análise dos índices hematológicos através de leitura óptica e por impedância. A concentração de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina direta. Através desta análise é possível obter a concentração de hemoglobina (Hb), bem como os valores dos demais índices hematológicos: Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Amplitude de Variação do Volume das Hemácias (*Red Distribution Width* - RDW).

O índice hematológico (obtido do resultado do Hemograma) que constituiu a variável dependente deste estudo foi a Concentração de Hemoglobina (Hb), índice este considerado pela Organização Mundial de Saúde como o determinante da presença de anemia. Segundo recomendação desta organização, concentração de hemoglobina abaixo de 11,0g/dL é determinante de anemia em gestantes.

As seguintes variáveis sociodemográficas e socioeconômicas foram investigadas através de entrevista: idade, escolaridade, ocupação, renda familiar em salário mínimo (SM), para avaliação da história obstétrica atual foi indagado sobre o uso de antianêmicos (ferro, ácido fólico e vitamina B12).

A análise estatística dos dados coletados na pesquisa foi processada pelo pacote estatístico SPSS® 9.0 for Windows. Foi realizada análise descritiva das variáveis do estudo. Na análise descritiva, as variáveis contínuas foram expressas através da média e do desvio padrão e as variáveis categóricas foram descritas em frequências.

O protocolo de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEFS (CEP-UEFS), sob número 046/2005 (CAAE 0047.0.059.000-05). Através do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi obtida a anuência do sujeito da pesquisa e/ou de seu representante legal.

RESULTADOS

A média de idade da amostra, calculada em anos, foi de $X = 24,8 \pm 6,1$, com faixa de distribuição de 12 a 44 anos (Figura 1). A comparação entre a distribuição de idade observada e a curva de distribuição normal esperada revela que não há uma distribuição homogênea em relação à idade (Figura 1).

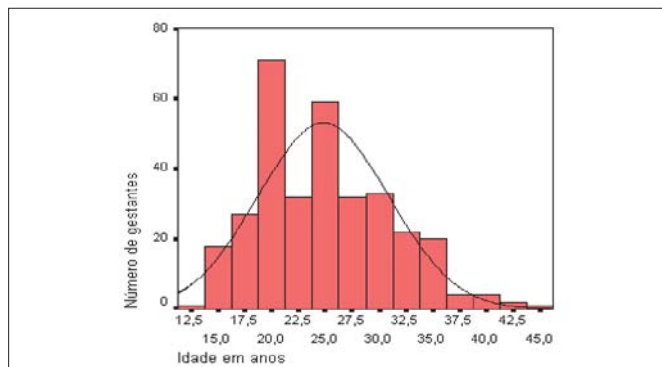


Figura 1: Histograma de distribuição das gestantes em função da idade.

Considerando o nível de escolaridade das gestantes, foi observado que a maioria delas ($n=132$; 40,3%) concluiu o ensino médio, seguidas em frequência pelas gestantes que tinham ensino médio incompleto ($n=110$; 33,7%). Apenas duas mulheres (0,6%) concluíram curso superior e somente uma referiu pós-graduação (0,3%). Dados apresentados na Figura 2.

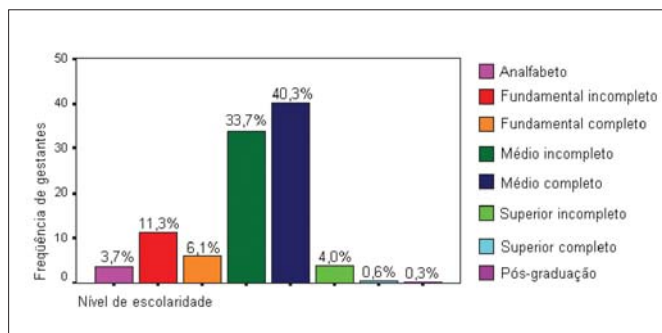


Figura 2: Frequência de gestantes por nível de escolaridade.

Em relação à ocupação houve predomínio de gestantes desempregadas com frequência de 19,7% ($n=64$) e de gestantes que são estudantes ($n=60$; 18,4%). A Figura 3 ilustra a distribuição das gestantes em relação à ocupação.

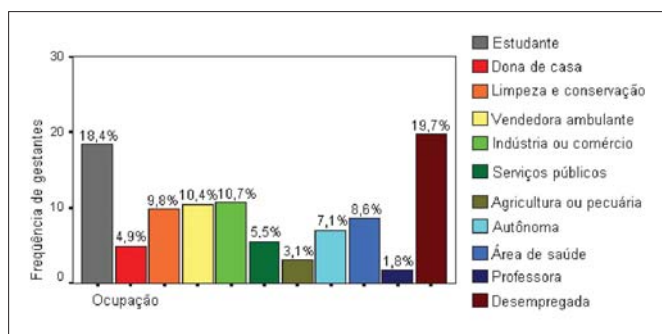


Figura 3: Frequência de gestantes em relação à ocupação principal.

A investigação da renda familiar expressa em salários mínimos recebidos por todos os membros da família, revelou que na família de 153 (46,9%) gestantes a média da renda familiar mensal estava na faixa de um a menos de dois salários mínimos, representando quase metade das gestantes entrevistadas. Na Figura 4 são apresentadas, em gráfico, as frequências de gestantes por categoria de renda mensal investigada.

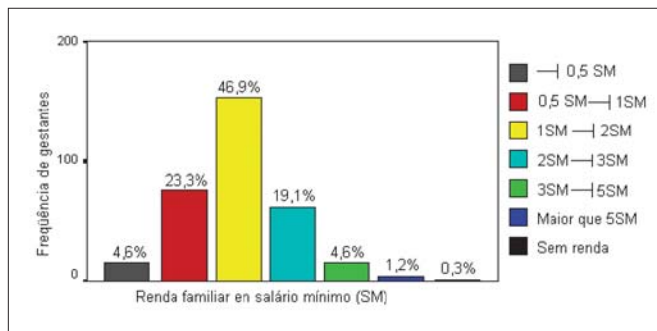


Figura 4: Frequência de gestantes de acordo com a renda familiar.

A maioria das gestantes (78,5%) fazia uso de algum tipo de medicamento antianêmico. A ingestão de sais de ferro de forma isolada representou o principal meio de prevenção da anemia. A figura 5 a seguir representa a frequência de gestantes em função do uso de antianêmicos.

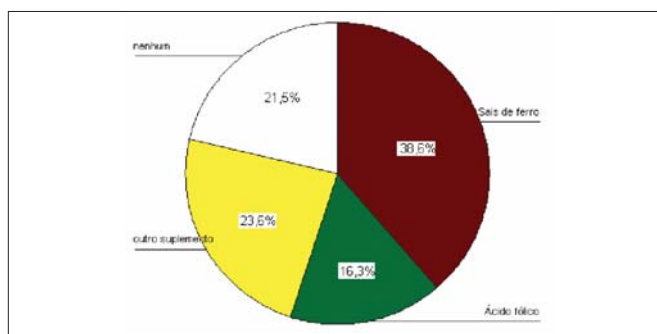


Figura 5: Porcentagem de gestante segundo o uso de antianêmico.

Concentração de hemoglobina abaixo de 11,0g/dL foi detectada em 104 gestantes. A prevalência de anemia obtida neste inquérito é, portanto, de 31,9% (Figura 6).

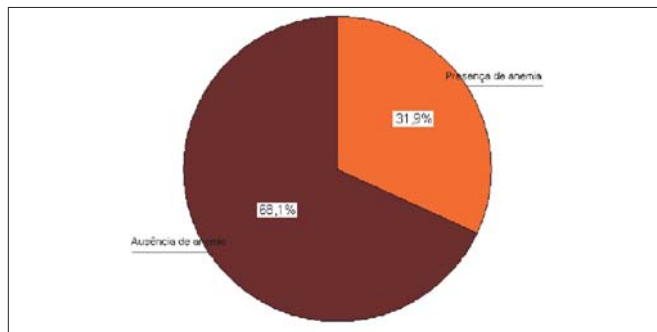


Figura 6: Prevalência de anemia em gestantes atendidas nas Unidades de Saúde no município de Feira de Santana.

O valor médio da amostra relativo à concentração de hemoglobina foi de $11,6\text{g/dL} \pm 1,2\text{g/dL}$, sendo o valor mínimo obtido igual a 6,0g/dL e o valor máximo de 16,5g/dL. A distribuição do número de gestantes em função dos valores da hemoglobina é apresentada na Figura 7. A curva de distribuição para este parâmetro revela uma razoável simetria e se aproxima da curva gaussiana, indicando adequação do modelo de distribuição contínua aos dados. A aderência ao modelo gaussiano está também evidenciada no gráfico Q-Q plot, onde as observações estão alinhadas em torno de uma reta (Figura 8).

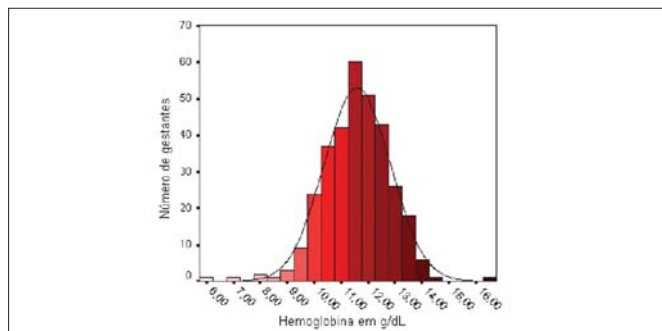


Figura 7: Distribuição do número de gestantes em função da concentração da hemoglobina em relação à distribuição normal.

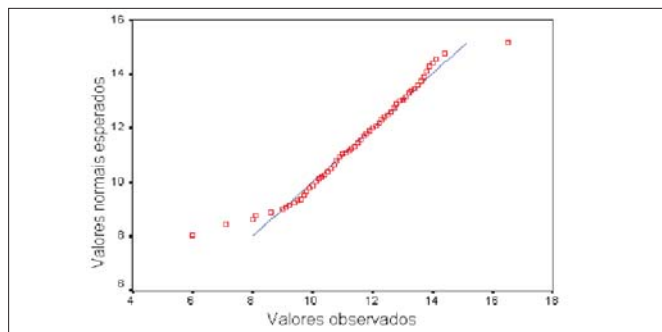


Figura 8: Gráfico Q-Q plot para distribuição da Hemoglobina em mg/dL.

A determinação da concentração de hemoglobina permitiu classificar a anemia segundo sua gravidade (WHO, 1972) em: anemia leve, moderada e grave. Segundo esta classificação, entre as gestantes anêmicas ($n = 104$), uma ($\approx 1,0\%$) apresentou anemia grave ($Hb < 7,0g/dL$); cinco gestantes ($4,8\%$) apresentaram anemia moderada (Hb entre $7,0$ e $9,9g/dL$); e 98 delas ($94,2\%$) apresentaram anemia leve (Hb entre $10,0$ e $10,9g/dL$).

DISCUSSÃO

A anemia, principalmente por carência alimentar de ferro biodisponível, representa problema nutricional hegemônico em nível de saúde coletiva no mundo atual, estimando-se sua ocorrência em 2.100.000.000 de casos, ou seja, mais que um terço de toda a população mundial. Entre os segmentos biológicos mais vulneráveis ao problema incluem-se as mulheres no período reprodutivo, particularmente durante a gestação, e as crianças nos primeiros anos de vida. A anemia é um problema de saúde pública generalizado, que tem consequências de grande alcance para a saúde humana e para o desenvolvimento social e econômico (OMS; UNICEF, 2004).

A anemia na gravidez destaca-se, não só pela frequência com que se manifesta, mas também pelos efeitos deletérios resultantes da baixa concentração de hemoglobina no sangue. A anemia é prejudicial tanto para a gestante quanto para o conceito, sendo associada a maior risco de morbimortalidade materno-fetal.

Mesmo com a observação de que as deficiências de micronutrientes representam um tema de interesse crescente, ainda não se dispõe, em muitos países e regiões das Américas e de outros continentes, de um quadro bem consolidado de informações que possibilite, com a desejada confiabilidade, dimensionar sua prevalência; descrever os grupos populacionais mais atingidos; delinear sua distribuição geográfica e identificar os fatores de risco mais relevantes na sua determinação (SANTOS, 2002a).

Infelizmente, as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), no que se refere aos procedimentos técnicos padronizados para a coleta, análise bioquímica, pontos de corte e critérios de classificação, não têm sido devidamente consideradas, em grande parte dos estudos de campo efetuados no Brasil objetivando avaliar o problema das anemias em nível populacional. Perde-se, por este motivo, a oportunidade de se consolidar um quadro comparativo dos resultados, fazendo uso de critério uniforme de coleta e apresentação (ROUQUAYROL, 2003, p. 400). Não se dispõe ainda, no Brasil, e na maior parte dos países, incluindo-se até nações desenvolvidas, de um quadro consolidado de informações consistentes que permita definir, com a necessária segurança, os níveis de prevalência de anemia em gestantes (SANTOS, 2002b).

No presente estudo, a título de contribuir para o conhecimento da prevalência de anemia em gestantes na cidade de Feira de Santana, foi avaliada amostra representativa das gestantes atendidas nas Unidades de Saúde do município no período compreendido entre outubro de 2005 e março de 2006. Os índices de prevalência obtidos são alerta aos órgãos municipais de saúde para a necessidade de estudos adicionais e para intensificação de campanhas objetivando a prevenção e o tratamento da anemia.

Arruda (1997) realizando estudo de deficiência de ferro, ácido fólico e anemia em gestantes atendidas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco obteve das 1007 gestantes examinadas, 311 ($30,9\%$) com níveis de hemoglobina abaixo de $11,0g/dL$.

No estudo presente a prevalência de anemia em gestantes atendidas em Unidades de Saúde no município de Feira de Santana com amostra representativa da população revelou uma frequência de $31,9\%$, similar, portanto, àquela descrita por Arruda em 1997 e em estudo realizado por Rodriguez, Szarfarc, Benicio (1991) em gestantes assistidas na sala de parto do Hospital Maternidade "Leonor Mendes de Barros" (HMLMB), no município de São Paulo cuja prevalência de anemia foi de $29,2\%$. Esses resultados são, contudo, muito superiores àqueles obtidos em estudo realizado por Guerra *et al.* (1990) no qual a prevalência de anemia em gestantes atendidas na rede estadual, no subdistrito do Butantan, município de São Paulo, foi de $12,4\%$.

A gravidez na adolescência preocupa pesquisadores, especialistas e autoridades em Saúde Pública, pela elevada prevalência e repercussões médicas e sociais. A gravidez na adolescência vem a ser uma situação de risco, pois a paciente comumente negligencia aspectos importantes da sua saúde (GALLETTA, 1997).

A prevalência de $39,4\%$ de anemia em adolescentes grávidas atendidas num centro de saúde especializado em pré-natal, descrita por Galletta (1997) aproxima-se daquelas descritas em revisão sobre a presença de anemia em adolescentes brasileiras grávidas em 1988, por Batista Filho *et al.* (1988), revelando prevalência elevada de anemia em gestantes adolescentes, tal como a proporção de $40,0\%$ encontrada na Paraíba e Pernambuco. Nogueira (1997) registrou a ocorrência de $35,0\%$ de anemia entre as adolescentes acompanhadas longitudinalmente durante o pré-natal no Piauí. Estudo mais representativo, desenvolvido por Szarfarc (1983), que avaliou a prevalência de anemia em usuárias de serviços de saúde de 15 localidades do Estado de São Paulo, envolvendo 507 adolescentes com menos de 17 anos e 706 com idade entre 18 e 19 anos, também evidenciou prevalências elevadas, que afetavam respectivamente $37,3\%$ e $36,1\%$ das gestantes.

A maior ocorrência de anemia bem como de outras defici-

ências nutricionais como já descrito, decorrem do nível educacional e cultural de indivíduos. O maior grau de instrução propicia meios para a prevenção de diversos agravos à saúde.

A avaliação do tipo de atividade principal (tipo de ocupação) desenvolvida pelas gestantes, foi mais um fator indicativo das condições socioeconômicas avaliadas neste estudo, diretamente relacionado com a renda familiar e, como esperado, revelou que entre as mulheres sem remuneração a ocorrência de anemia foi significativamente maior. Não existem dados na literatura que relatem a ocorrência de anemia em populações brasileiras em função do tipo de ocupação, o que provavelmente se deve ao fato de que na maioria dos estudos a renda familiar é considerada como indicador suficiente para avaliação da associação entre anemia e fatores socioeconômicos. Em estudo semelhante realizado por GUERRA *et al.* (1990) foi observada prevalência de anemia de 22,5% em gestantes, segundo a renda familiar em salário mínimo per capita da família, para aquelas com renda menor que 0,5 salários. Alvarenga *et al.* (1973) estudaram o "índice de status socioeconômico" da família da mulher grávida que freqüentava o Centro de Saúde Geraldo Paula Souza do Município de São Paulo e encontraram distribuição das gestantes, segundo a renda mensal per capita com prevalência superior em gestantes com renda inferior a um salário mínimo.

A desnutrição e a anemia aumentam o risco de desenvolver infecções severas, levando ao aumento da mortalidade infantil e pré-escolar. Seu controle depende, além da melhoria das condições socioeconômicas, da prevenção e do tratamento precoce. Embora o papel da suplementação alimentar no controle da desnutrição ainda seja discutido, está bem comprovada a utilidade da suplementação com sais de ferro no tratamento da anemia.

AGRADECIMENTOS

Aos sujeitos desta pesquisa, as gestantes, que confiaram seus dados pessoais e contribuíram para a realização deste projeto. Os autores agradecem ao corpo clínico do Laboratório Hemolabor – Diagnóstico Laboratorial por permitir a utilização dos dados hematológicos das gestantes para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ALVARENGA, A. T.; CIARI JR., C.; SANTOS, J. L. F. Índice de status socioeconômico da família da mulher grávida que freqüenta o Centro de Saúde Geraldo de Paula Souza da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 7 p. 351-67, 1973.
2. ARMINDA, L. S.; SAKURAI, E.; SOUZA, M. C. F. M. Dimensionamento de amostras em estudos clínicos e epidemiológicos. 32 ed. Salvador: RRABE, 2001.
3. ARRUDA, I. K. G. Deficiência de ferro, folato e anemia em gestantes atendidas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco: Magnitude, fatores de risco e implicações nos seus conceitos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1997.
4. BATISTA FILHO, M., ESQUIVEL, I.M., RIBEIRO, F.S.N. Anemia em adolescentes gestantes no Brasil. In: Coletânea sobre saúde reprodutiva do adolescente brasileiro. Brasília: [s.n], p.121-126, 1988.
5. GALLETTA, M.A.K.; LIPPI, A.T.A.; GIRIBOLA, A.; MIGUELEZ, J.; ZUGAIB, M. Resultados obstétricos e perinatais em gestantes adolescentes atendidas em pré-natal especializado. *Revista Ginecologia Obstetrícia*, v. 8, n. 1, p. 10-19, 1997.
6. GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ; UNICEF. Crianças e adolescentes no Piauí: saúde, educação e trabalho. Brasília: UNICEF, 1992.

7. GUERRA, E.M.; BARRETO, O.C.O.; VAZ, A.J.; SILVEIRA, M.B. Prevalência de anemia em gestantes de primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. São Paulo, n. 24, p. 380-386, 1990.
8. INAN – Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Pesquisa estadual de saúde e nutrição; Saúde, Nutrição, Alimentação e condições sócio-econômicas no Estado de Pernambuco. Recife: UFPE, 1998.
9. LABRADA, M.C.P.; RODRÍGUEZ, A.F.B.; DIEPPA, O.T.; MEGRET, O.L. Prevalencia de anemia en Gestantes en un Área de Salud. *Rev. Cubana Med Gen Integr.* v. 1, n. 16, p. 25-30, 2000.
10. NOGUEIRA, N.N. Estudo comparativo sobre os efeitos da suplementação com ferro (diferentes concentrações), ácido fólico e zinco no estado nutricional de adolescentes grávidas e de seus conceitos. São Paulo, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997.
11. OMS; UNICEF. Declaración conjunta de la Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, La anemia como centro de atención. Organización Mundial de la Salud, 2004.
12. RODRIGUEZ, J.G. Prevención y control de la carencia de hierro en la embarazada. *Revista Cubana Aliment Nutr.* v. 2, n. 12, p.125-33, 1998.
13. RODRIGUEZ, O.T.S.; SZARFARC, S.C.; BENICIO, M.H.A. Anemia e desnutrição maternas e sua relação com o peso ao nascer. *Revista de Saúde Pública*. v. 25, n. 3, 1991.
14. ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. *Epidemiologia & Saúde*. 6 ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 2003.
15. SANTOS, L. M. P. (org.). Bibliografia sobre deficiência de micronutrientes no Brasil 1990-2000: volume 2a- anemia / Leonor Maria Pacheco Santos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2002a.
16. SANTOS, L. M. P. (org.). Bibliografia sobre deficiência de micronutrientes no Brasil 1990-2000: volume 2b- anemia / Leonor Maria Pacheco Santos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2002b, p. 264.
17. SZARFARC, S.C. Densidade do ferro biodisponível em uma dieta habitual no Estado de São Paulo. São Paulo: *Revista de Saúde Pública*, v.17, n.4, p.290-296, 1983.
18. WHO (World Health Organization). Nutritional anaemia. Technical Report Series. Report of a WHO Group of Experts World Health Organization, n. 503, 1972.
19. WHO; MHC; MSM. The Prevalence of anaemia in women: A tabulation of available information. Geneva: World Health Organization, 1992.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Freqüência de hipotireoidismo em pacientes com distúrbio bipolar tratados com carbonato de lítio

Frequency of hypothyroidism in patients with bipolar disorder treated with lithium

Salimara Rampelotto Botton¹; Sandra Trevisan Beck²; Bruno Rampelotto Botton³;
Martha Noel⁴ & Andreza Fabro de Bem⁵

RESUMO - O carbonato de lítio é um estabilizador do humor usado no tratamento de pacientes portadores de Transtorno Bipolar do Humor. A influência do carbonato de lítio no eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide pode trazer consequências sérias aos usuários dessa droga, pois um dos seus efeitos colaterais é a inibição da função da tireóide com prevalência do Hipotireoidismo sintomático e Hipotireoidismo subclínico nos pacientes. Com o intuito de verificar a prevalência de hipotireoidismo em pacientes com Distúrbio Bipolar tratado com carbonato de lítio, foram revisados prontuários de 62 pacientes adultos, que consultaram no Ambulatório de Distúrbio Bipolar do Hospital Universitário de Santa Maria entre janeiro de 1973 e julho de 2003. A amostra foi constituída por 23 homens e 31 mulheres sendo 8 excluídos por falta de dados ou apresentarem outro tipo de diagnóstico. Observamos que a prevalência do desenvolvimento do hipotireoidismo foi maior entre as mulheres (41,9%) do que nos homens (21,7%) portanto, as mulheres foram mais susceptíveis ao desenvolvimento do hipotireoidismo do que os homens. A determinação dos hormônios da tireóide antes e durante o uso do carbonato de lítio é de fundamental importância no monitoramento das complicações causadas pelas alterações dos hormônios da tireóide.

PALAVRAS-CHAVE - Distúrbio bipolar, doença da tireóide, hipotireoidismo, lítio.

SUMMARY - Lithium is a mood stabilizer used to treat patients with bipolar mood disorder. The influence of lithium in the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis can bring serious consequences to the users of this drug because one of its collateral effects is the inhibition of thyroid function with prevalence of symptomatic hypothyroidism and subclinical hypothyroidism in patients. Sixty-two charts of adult patients that consulted in the Ambulatory of Bipolar Disorders at University Hospital of Santa Maria were reviewed between January 1973 and July 2003 in order to verify the prevalence of hypothyroidism in patients with bipolar disorder treated with lithium. The sample had 23 men and 31 women. Eight patients were excluded because of the lack of data or because they have presented another type of diagnostic. We observed that the prevalence to develop hypothyroidism in patients using lithium was bigger in women (41,9%) than in men (21,7%). Therefore women were more susceptible to develop hypothyroidism than men. Thyroid hormones determination before and during lithium treatment is really important to the control of complications caused by thyroid hormones alterations.

KEYWORDS - Bipolar disorder, thyroid antibodies, hypothyroidism, lithium.

INTRODUÇÃO

A depressão é o componente central da desordem afetiva bipolar. Existem três hipóteses para a etiologia da doença: hormonal, neuroquímica e genética. A característica essencial do transtorno bipolar do humor é a ocorrência de um episódio maníaco distinto. Todavia, a maioria dos indivíduos podem desenvolver eventuais episódios depressivos (Oliveira e Lima, 1996).

A utilização do lítio foi primeiramente descrita em 1981 por Montigny e colaboradores, e desde então tem sido recomendada como estratégia de primeira escolha para pacientes com desordens bipolares (Bauer *et al.*, 2002).

O lítio é absorvido por via oral de forma rápida e completa. O lítio não se une às proteínas plasmáticas nem é metabolizado, e elimina-se 95% de forma inalterada pelo rim. A eliminação é inicialmente rápida e, após tratamento prolongado, torna-se mais lenta. Na forma ativa o lítio pode ser reabsorvido 80% no túbulo proximal. A velocidade de excreção diminui com o aumento da idade. No início do tratamento a meia vida é bifásica, a concentração sérica diminui com rapidez durante 5 a 6 horas iniciais, seguida de uma diminuição gradual durante as 24 horas seguintes. O início de sua ação terapêutica pode demorar de 1 a 3 semanas (Goodman *et al.*, 2003).

A influência do carbonato de lítio no eixo hipotálamo-hipó-

fise-tireóide pode trazer consequências sérias aos usuários dessa droga, pois um dos efeitos colaterais é a inibição da função da tireóide, com prevalência do hipotireoidismo sintomático em 3-5% (Berens *et al.*, 1970 ; Albrecht & Hopf, 1982) e hipotireoidismo subclínico em 21% dos pacientes (Perrild *et al.*, 1990). O lítio reduz a liberação de hormônios tireóideos (T3, T4) e aumenta a regulação basal, na qual o hormônio liberador de tireotropina (TRH) estimula a liberação do hormônio estimulador da tireóide (TSH). Alguns autores detectaram anticorpos tireoglobulina (TAB) e peroxidase (TPO) em pacientes tratados com lítio. (Leroy *et al.*, 1988 ; Bocchetta *et al.*, 1991). Existe uma ampla variação entre os estudos que tratam da prevalência de anticorpos tireoideanos, sendo encontrados valores entre 7,8% (Sigman *et al.*, 1984) a 48,7% (Lazarus *et al.*, 1986) dependendo da população estudada.

Ainda não está bem estabelecido o papel do lítio na etiologia do hipotireoidismo desenvolvido nos pacientes com doença bipolar (Bauer *et al.*, 2001). Kupka e colaboradores (2002) sugeriram que o tratamento com lítio não foi relacionado com a etiologia da tireóide autoimune. Todavia, quando tratados com lítio os pacientes bipolares apresentam maior risco ao desenvolvimento do hipotireoidismo (Kleiner *et al.*, 1999). Também é sugerido que o lítio induza a exacerbação da predisposição à tireoidite de Hashimoto autoimune por imunomodulação (Myers *et al.*, 1985).

Recebido em
Aprovado em

Artigo apresentado para obtenção de título de Especialista do Programa de Pós-graduação em Laboratório Clínico II do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria.

¹Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário de Santa Maria -

²Professora de Imunologia Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -

³Acadêmico do Curso de Medicina

⁴Médica Psiquiátrica do Hospital Universitário de Santa Maria

⁵Professora de Bioquímica Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -
Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria - RS - Brasil

Estudos recentes feitos por Cole e colaboradores (2002), demonstraram evidências que pacientes efetivamente doentes são sensíveis a variações na função da tireóide. Baixos níveis de T3 e T4 e altos valores de TSH são associados significativamente com baixa resposta ao tratamento durante fase aguda de depressões.

O acompanhamento com dosagens bioquímicas, através de análise quantitativa dos hormônios TSH, T3, T4 ou T4L, permitem que os pacientes sejam encaminhados ao endocrinologista, caso ocorra uma modificação nos níveis desses hormônios.

O presente trabalho procurou verificar a prevalência do desenvolvimento do hipotireoidismo nos pacientes submetidos ao tratamento com carbonato de lítio do Ambulatório de Distúrbio Bipolar do Hospital Universitário de Santa Maria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Um estudo retrospectivo foi realizado através da investigação de prontuários de 62 indivíduos (38 do sexo feminino e 24 do sexo masculino), do Ambulatório de Distúrbio Bipolar do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), os quais fizeram uso de carbonato de lítio e tiveram determinados os níveis dos hormônios tireoidianos no período de janeiro de 1973 a julho de 2003. A idade dos indivíduos variou entre 17 e 83 anos.

Metodologia

Os testes sorológicos foram realizados através de métodos automatizados disponíveis no Laboratório Central do HUSM. A determinação de TSH, T3, T4, T4L, foi realizado pelo método de imunoensaio por quimioluminescência (CLIA), pelo aparelho IMMULITE da DPC (Diagnostic Products Corporation). Alterações nestas dosagens foram consideradas como indicativo de inibição das funções da tireóide. Para a caracterização dos indivíduos como hipotireóides foram observados os valores de T3, T4 ou T4L abaixo dos intervalos de referência (T3: 0,81- 1,90 ng/dL; T4: 4,9-12,0 µg/dL; T4L: 0,7-1,85 ng/mL), juntamente com o aumento dos níveis do TSH acima dos valores de referência (TSH: 0,4 – 4,5 µUI/mL), bem como as considerações clínicas anotadas nos prontuários.

Os níveis sorológicos de lítio foram determinados por metodologia de eletrodos íon-seletivo. A terapia com carbonato de lítio é monitorada através de dosagens sorológicas. As concentrações sanguíneas do lítio, em adultos devem estar entre 0,7 e 1,4 mEq/L e em idosos entre 0,1 e 0,2 mEq/L. Dos 62 casos analisados, 8 pacientes foram excluídos do estudo (7 do sexo feminino e 1 do masculino), onde 2 deste por insuficiência de dados e o restante por apresentarem hipotireoidismo.

RESULTADOS

Análise criteriosa dos dados clínicos e laboratoriais contidos nos prontuários demonstrou diferenças nas manifestações tireoidianas entre homens e mulheres (Tabela I). A proporção de mulheres que desenvolveram hipotireoidismo com a terapia com carbonato de lítio foi de 41,9%, enquanto entre os homens esta proporção foi reduzida à metade (21,7%). Todavia 58,1% das mulheres e 78,3% dos homens não demonstraram alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos com o uso do carbonato de lítio (Figura 1). A proporção de hipotireoidismo na totalidade dos pacientes com distúrbio bipolar estudados, foi de 33,3%.

O tempo de exposição ao carbonato de lítio não teve relação com o desenvolvimento das alterações tireoidianas. Entretanto os indivíduos com mais de 50 anos no momento do diagnóstico do distúrbio bipolar e conseqüente início da terapia com o lítio, desenvolveram hipotireoidismo mais rápido que os indivíduos mais novos. (Figura 2).

O tempo médio para o desenvolvimento do hipotireoidismo após o início da terapia com lítio foi em média 7 anos para ambos os sexos (Figura 3).

TABELA I
Frequência do Hipotireoidismo em pacientes tratados com carbonato de lítio segundo o sexo.

Sexo	Hipotireóide	Eutireóide	Total
Feminino	13 (41,9%)	18 (58,1%)	31
Masculino	05 (21,7%)	18 (78,3%)	23
Total	18 (33,3%)	36 (66,7%)	54

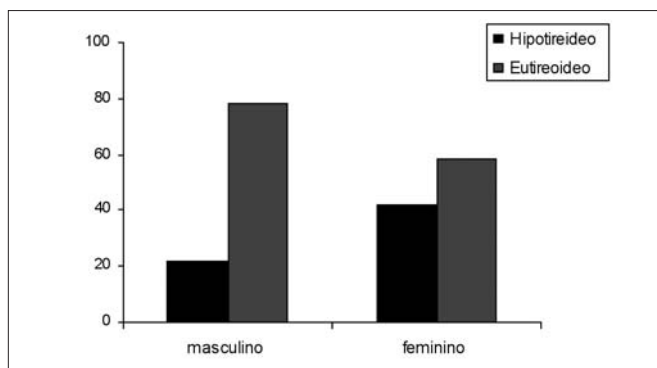


Figura 1: Prevalência em percentagem das doenças tireoidianas de acordo com o sexo dos indivíduos analisados.

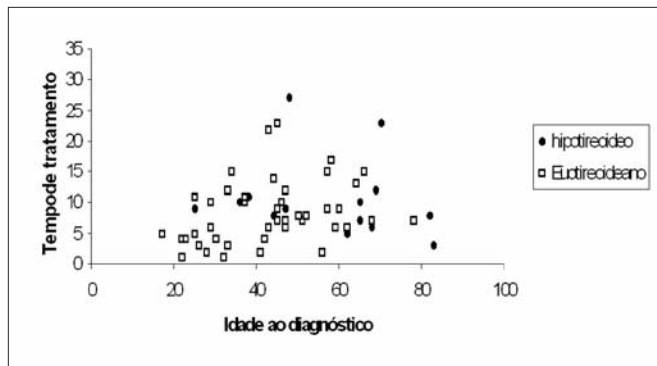


Figura 2: Tempo de tratamento (anos) com carbonato de lítio e idade no momento da dosagem dos hormônios tireóideanos.

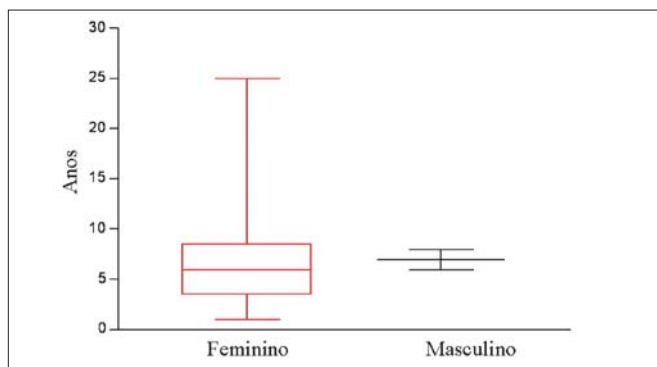


Figura 3: Tempo médio (anos) para desenvolvimento das alterações tireoidianas.

DISCUSSÃO

Juntamente com os efeitos terapêuticos do tratamento de pacientes com distúrbio bipolar, o carbonato de lítio pode levar ao hipotireoidismo sintomático ou subclínico, provavelmente devido à indução da tireoidite autoimune com níveis aumentados de anticorpos tireoideanos, (Albrecht and Hopf, 1982; Smigan *et al.*, 1984; Bocchetta *et al.*, 1991).

Recentes evidências indicam que o lítio inibe a função dos linfócitos T-supressores, cujo papel é prevenir a formação descontrolada dos anticorpos contra antígenos produzidos pelo próprio indivíduo. Esta influência na atividade celular pode interferir nos mecanismos autoimunes na glândula tireóide. Com infiltração de linfócitos sob tais condições, a textura microfoliar do órgão pode mudar para uma estrutura tissular com difusões hipogênicas, como observado em pacientes com doença de Graves (Becker *et al.*, 1989; Schiemann *et al.*, 1999) e tireoidite de Hashimoto (Espinase *et al.*, 1980; Hayashi *et al.*, 1985, 1986; Gutenknust *et al.*, 1989; Marcocci *et al.*, 1991).

Como já se esperava, nossos dados comprovaram que pacientes que receberam terapia com lítio, desenvolvem hipotireoidismo sintomático ou subclínico, independente do tempo de uso dessa medicação provavelmente devido à inibição do hormônio regulador com compensatório aumento da regulação do TSH. Os resultados desse estudo refletem os achados de outros pesquisadores, (Bocchetta *et al.*, 1991; Kupka *et al.*, 2002; Bschor *et al.*, 2003) os quais também observaram a diminuição da secreção dos hormônios tireoidianos pelo sistema HPT (hipotálamo-hipófise tireóide) durante a terapia com carbonato de lítio.

Estudos de acompanhamento da terapia com carbonato de lítio por 6 e 10 anos (Bocchetta *et al.*, 1996 e 1999) demonstraram a possível indução de anticorpos tireoideanos pelo lítio. Da mesma forma Kupka e colaboradores (2002), demonstraram que pacientes com desordem bipolar tiveram uma maior prevalência ao aumento dos anticorpos tireoideanos, sendo as mulheres mais afetadas a essas falhas da tireóide. A alta imunidade da tireóide e a exposição do lítio foram dois fatores de risco independentes, mas cumulativos para o desenvolvimento do hipotireoidismo nos pacientes com desordem bipolar, e as mulheres apresentaram mais riscos para hipotireoidismo do que homens.

Os resultados deste estudo demonstraram que o tratamento de pacientes com desordens afetivas com carbonato de lítio induziu o hipotireoidismo em 33,3% do total dos casos analisados, sendo as mulheres mais susceptíveis ao desenvolvimento do hipotireoidismo (41,9%) do que os homens (21,7%). A determinação dos hormônios da tireóide antes e durante o uso do carbonato de lítio é de fundamental importância no monitoramento das complicações causadas pelas alterações dos hormônios da tireóide.

REFERÊNCIAS

- Albrecht, J.; Hopf, U. Humoral autoimmune phenomena under long-term treatment with lithium with special regard to thyroidal autoantibodies. *Klin. Wochenschr.* 1982; 60: 1501-4.
- Bauer, M.; Mhybrow, P.C. Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. *World Biol Psychiatry.* 2001; 2:57-67.
- Bauer M, Whybrow PC, Angst J, Versiani M, Möller HJ; World Federation of Societies Biological Psychiatry Task Force on Treatment Guidelines for Unipolar Depressive Disorders. guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, Part 1: acute and continuation treatment of major depressive disorder. *World Biol Psychiatr.* 2002; 3:5-43.
- Becker, W.; Frank, R.; Börner, W. Bedeutung einer quantitativen Grauwertanalyse des Sonogramms bei 'diffusen' Erkrankungen der Schilddrüse. *Fortschr. Röntgenstr.* 1989; 150, 66-71.
- Berens, S.C.; Bernstein, R.S.; Robbins, J; Wolff J. Antithyroid effects of lithium.

- J. Clin. Invest. 1970; 49: 1357-67.
- Bocchetta, A.; Arda, R.; Burrai, C. Ten-year follow-up of lithium patients with special reference to thyroid function [poster abstract]. *Bipolar Disord* 1. 1999; (suppl 1):25.
- Bocchetta, A.; Bernardi, F.; Pedditz, M, Loviselli A, Velluzzi F, Martino E, Del Zompo M. Thyroid abnormalities during lithium treatment. *Acta Psychiatr. Scand.* 1991; 83: 193-8.
- Bocchetta, A.; Cherchi, A.; Loviselli, A.; Mossa P, Velluzzi F, Dera R, Del Zompo M. Six-year follow-up of thyroid function during lithium treatment. *Acta Psychiatr Scand.* 1996; 94:45-48.
- Bschor, L.E.; Baethge, C.; Adli, M. Lewitzka U; Eichmann U.; Bauer M. Hypothalamic-pituitary-thyroid system activity during lithium augmentation therapy in patients with unipolar major depression. *Psychiatry Neurosci.* 2003; 28 (3):210-6.
- Cole, D.P.; Thase, M.E.; Mallinger, A.G.; Soares J.C., Luther J.F., Kupfer D.J., Frank E. Slower treatment response in bipolar depression predicted by lower pretreatment thyroid function. *Am J Psychiatry.* 2002;159:116-21.
- Espinasse, P. Thyroid echography in chronic autoimmune lymphocytic thyroiditis. *J Radiol.* 1983 ,64(10):537-44.
- Goodman, A.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. The Pharmacological Basis of Therapeutics: Goodman & Gilman. 10ª edição, McGraw-Hill Interamericana do Brasil: São Paulo, 2003.
- Gutenknust, R.; Hafemann, W.; Mansky, T. Scriba PC. Ultrasonography related to clinical and laboratory findings in lymphocytic thyroiditis. *Acta Endocrinol.* 1989;121, 129-135.
- Hayashi, N.; Tamaki, N.; Konishi, J. Yonekura Y., Senda M., Kasagi K, Yamamoto K, Iida Y, Misaki T, Endo K. Sonography of Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Ultrasound.* 1986; 14, 123-126.
- Hayashi, Y.; Tamai, H.; Fukata, S. Hirota Y, Katayama S, Kuma K, Kumagai L.F, Nagataki S. A long term clinical, immunological, and histological follow-up study of patients with goitrous chronic lymphocytic thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985; 61, 1172-1178.
- Kleiner, J.; Altshuler, L.; Hendrick, V. Hershman J.M. Lithium-induced subclinical hypothyroidism: Review of the literature and guidelines for treatment. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60:249-255.
- Kupka, R.W.; Nolen, W. A; Post, R. M.; McElroy S.L, Altshuler L.L, Denicoff K.D, Frye M.A, Keck PE Jr, Leverich GS, Rush A.J, Suppes T, Pollio C, Drexhage H.A High Rate of Autoimmune Thyroiditis in Bipolar Disorder: Lack of Association with Lithium Exposure. *Biological Psychiatry.* 2002; 51:305-311.
- Lazarus, J.H.; McGregor, A.M.; Ludgate, M.; Darke C, Creagh FM, Kingswood C.J. Effect of lithium carbonate therapy on thyroid immune status in manic depressive patients: A prospective study. *J. Affect. Disord.* 1986; 11; 155-160.
- Leroy, M. C.; Villeneuve, A.; Lajeunesse, C. Lithium, thyroid function and antithyroid antibodies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1988; 12(4); 483-90.
- Marcocci, C.; Vitti, P.; Cetani, F. Catalano F, Concetti R, Pinchera A. Thyroid ultrasonography helps to identify patients with diffuse lymphocytic thyroiditis who are prone to develop hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991; 72, 209-213.
- Montigny, C.; Grunberg, F.; Mayer, A.; Deschenes JP. Lithium induces rapid relief of depression in tricyclic antidepressant drug non-responders. *Br J Psychiatry.* 1981;138:252-6.
- Myers, D.H.; Carter, R. A.; Burns B.H.; Armond A, Hussain S.B, Chengappa V.K. A prospective study of the effects of lithium on thyroid function and on the prevalence of antithyroid antibodies. *Psychol Med.* 1985; 15:55-61.
- Oliveira, I. R.; Lima, M. S. Transtornos bipolares In: Rotinas em Psiquiatria, Porto Alegre: Artes Médicas. 1996; p. 153.
- Perrild, H.; Hegedus, L.; Bastrup, P.C. Kayser L.; Kastberg S. Thyroid function and ultrasonically determined thyroid size in patients receiving long-term lithium treatment. *Am. J. Psychiatry.* 1990;147 (11), 1518-1521.
- Schiemann, U.; Gellner, R.; Riemann, B.; Schierbaum G, Menzel J, Domschke W, Hengst K. Standardized grey scale ultrasonography in Graves' disease: correlation to autoimmune activity. *Eur. J. Endocrinol.* 1999; 141, 332-336.
- Smigan, L.; Wahlin, A.; Jacobsson, L.; von Knorring L. Lithium therapy and thyroid function test. A prospective study. *Neuropsychobiol.* 1984; 11: 39-43.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Andreza Fabro de Bem
Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faixa de Camobi, Km 9
CEP: 97105-900 Santa Maria, RS
Fone: 55- 32208464
E-mail: debemandreza@yahoo.com.br

Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real*

Validation of a *Chlamydia trachomatis* detection method by Real Time Polymerase Chain Reaction

Lilian de Assis Poiares^{1,2}, Fabiano Sandrini^{1,2}, Paulo de Sá Osório^{1,2}, Álvaro Largura^{1,2} & Rita de Cássia Garcia Simão³

RESUMO - Infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* são recentemente reconhecidas como as mais prevalentes e estão entre as mais prejudiciais doenças sexualmente transmissíveis (DST) no mundo. A ausência de sintomas dificulta o diagnóstico clínico das infecções clamidiais. Um dos desafios na prevenção das infecções causadas por *C. trachomatis* é a disponibilidade de diagnósticos laboratoriais com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. No presente estudo, foi comparado o desempenho do testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) COBAS Amplicor® *Chlamydia trachomatis* (Roche) e PCR em tempo real (SYBR® – Green), usados para detecção de *Chlamydia trachomatis* em espécimes de urina e secreções urogenitais. O COBAS Amplicor® (Roche) é um teste de PCR convencional e foi usado como ferramenta para controle e teste de padrão ouro para diagnóstico no presente trabalho. Um total de 136 amostras de secreção endocervical (61), secreção uretral (14) e urina (61), foram obtidas de pacientes submetidos a testes de detecção de *Chlamydia trachomatis* no Laboratório Alvaro S/A. Os métodos de PCR em tempo real e COBAS Amplicor® (Roche) foram igualmente sensíveis para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de secreção uretral. Entretanto, em análises de urina e secreção endocervical o teste COBAS Amplicor® (Roche) mostrou 57% e 33% de positividade, respectivamente, contra 47% e 24% de positividade obtidos para as mesmas amostras usando a PCR em tempo real. A maior sensibilidade (100%) obtida usando-se o ensaio de PCR em tempo real, foi em análises das amostras de secreção endocervical. A PCR em tempo real, comparada com o teste padrão ouro, mostrou uma alta especificidade (100%) e um valor preditivo positivo de 100% para as diferentes amostras clínicas estudadas. Em conclusão, os dados apresentados neste estudo indicam que a PCR em tempo real mostrou um alto desempenho para detecção de *C. trachomatis* em diferentes espécimes clínicos. Além disso, este método pode ser usado como uma poderosa ferramenta no diagnóstico e investigação epidemiológica de infecções associadas com *C. trachomatis*.

PALAVRAS-CHAVE - *Chlamydia trachomatis*, PCR, diagnóstico

SUMMARY - Infections caused by *Chlamydia trachomatis* are now recognized as the most prevalent and are among the most damaging of all sexually transmitted diseases (STD) worldwide. Lack of symptoms makes clinical diagnosis of chlamydial infection difficult. One of the challenge in the prevention of *C. trachomatis* infections is the availability of laboratory diagnostics with high sensitivity, specificity and reliable. In the present study, the performance of conventional polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR (SYBR® – Green) tests used for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine and urogenital specimens were compared. The COBAS Amplicor® (Roche) is a conventional PCR and was used as a tool of control and gold standard test for diagnosis in this work. A total of 136 samples of endocervical secretion (61), urethral secretion (14) and urine (61), were obtained from patients submitted of *Chlamydia trachomatis* detection tests of Laboratório Alvaro S/A. Real-time PCR (SYBR® – Green) and COBAS Amplicor® *Chlamydia trachomatis* Test (Roche) methods were equally sensitivity for diagnostic of *C. trachomatis* in urethral secretion samples. However, in analyses of the urine and endocervical secretion samples the COBAS Amplicor® test displayed 57% and 33% of positivity, respectively, against 47% and 24% of positivity obtained for the same samples using Real-time PCR. The highest sensibility (100%) using Real-time PCR assay was obtained in analyses of endocervical secretion samples. Real-time PCR, comparing with our gold standard showed a high specificity (100%) and a positive predictive value of 100% for different clinical samples studied. In conclusion, the data presented in this study indicate that PCR - Real time have shown a high performance for detection of *C. trachomatis* in different clinical specimens. Moreover, this method can be used as a powerful tool in diagnostic and epidemiological investigation of infection associated with *C. trachomatis*.

KEYWORDS - *Chlamydia trachomatis*, PCR, diagnosis

INTRODUÇÃO

A disseminação das infecções de transmissão sexual vem assumindo importância crescente. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram aproximadamente 250 milhões de casos novos a cada ano. Dentre estes, as infecções por *Chlamydia trachomatis* têm sido cada vez mais reconhecidas e prevalentes em pacientes de ambos os sexos. Estas infecções já superam as doenças sexualmente transmissíveis (DST) clássicas tais como a sífilis e gonorréia, transformando-se em um sério problema de saúde pública^{14,19,27}. Não há dados epidemiológicos de infecções específicas por *C. trachomatis* no Brasil. Dados dos Estados Unidos sugerem que a infecção por esse patógeno é a mais comum DST, com uma estimativa de 4,5 milhões de casos ao ano^{18,19,24, 26}. Os estudos epidemiológicos publicados têm demonstrado

uma prevalência substancial em adultos e jovens sexualmente ativos e relatam taxas de prevalência de 5 a 20% entre mulheres que freqüentam clínicas de planejamento familiar; 20 a 40% em mulheres e garotas adolescentes, sexualmente ativas, que freqüentam clínicas de DST e 25% de todas as mulheres atendidas em clínicas ginecológicas. Cerca de 8% das mulheres jovens são assintomáticas e 3 a 5% dos homens também não apresentam sintomas genitourinários embora sejam portadores de *C. trachomatis*³. Além do fato desta bactéria ser considerada o mais comum microrganismo sexualmente transmissível em todo o mundo, é também a principal causa de infertilidade em mulheres. Isto tem preocupado especialistas da área da saúde, principalmente pelo fato de alguns pacientes apresentarem sintomas brandos ou ausentes da infecção causada por *C. trachomatis*^{7,8,11,12}. Este microrganismo causa ainda uma

Recebido em
Aprovado em
*Laboratório Alvaro
†Laboratório Alvaro

³Instituto de Investigação Científica do Paraná, Cascavel – Paraná.

²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel, PR.

série de síndromes clínicas em homens e em mulheres²⁴, sendo a causa mais comum de uretrites e cervicites, incluindo sérias seqüelas como doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, gravidez ectópica e epididimites^{6,18}.

A família *Chlamydiaceae* é constituída de um gênero denominado *Chlamydia*, que apresenta três espécies patogênicas ao homem, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia psittaci*. *C. trachomatis* é o agente causador do tracoma que pode levar a cegueira na espécie humana, causa a uretrite não-gonocócica e o linfogranuloma venéreo (LGV), outra DST. *C. pneumoniae* e *C. psittaci* são agentes etiológicos de grande parte das infecções respiratórias²⁵.

C. trachomatis são bactérias do tipo cocos Gram-negativos que variam de 0,2 a 1,5 µm de tamanho^{14,20,25} e atuam como parasitas intracelulares obrigatórios de células eucarióticas, sendo incapazes de sintetizar ATP. Infectam somente células humanas e são usualmente transmitidas via contato sexual³. Bactérias do gênero *Chlamydia* possuem um ciclo de desenvolvimento peculiar caracterizado pela replicação dentro do citoplasma da célula hospedeira. Durante este ciclo de vida bifásico ocorre a formação de duas estruturas bem distintas: os corpos elementares (CE) e os corpos reticulares (CR). Os CE são adaptados à sobrevivência extracelular e a iniciar o processo de infecção. Após a adesão à célula eucariótica, os CE entram na célula por endocitose e permanecem em vacúolos intracelulares denominados corpos de inclusão. Em seguida, os CE mudam para uma forma metabolicamente ativa originando os CR, os quais estão adaptados à multiplicação intracelular^{14,20,25}.

As manifestações clínicas das infecções por *C. trachomatis* são produzidas em consequência da destruição direta das células durante a multiplicação bacteriana intracelular e da resposta inflamatória do hospedeiro¹⁴. Apesar de *C. trachomatis* ser antigenicamente complexa, a bactéria expressa dois antígenos que estão relacionados ao diagnóstico e à patogênese, um lipopolissacarídeo de superfície (LPS) e a proteína de membrana externa MOMP ("Major Outer Membrane Protein")²⁰. Variantes sorológicas com base no LPS são encontradas para *C. trachomatis*, de modo que os sorotipos A-C colonizam preferencialmente os olhos e causam o tracoma, sorotipos D-K colonizam o trato genital e causam infecções genitais e os sorotipos L1-L3 causam o linfogranuloma venéreo (LGV)²¹. Assim como os lipopolissacarídeos, a proteína MOMP codificada pelo gene *omp1*, está presente em todas as espécies patogênicas de *Chlamydia*. MOMP é muito usada para determinação genotípica de *C. trachomatis*, o gene *omp1* apresenta cinco regiões conservadas e quatro variáveis (VDI e VDIV) que diferem consideravelmente entre as espécies de *Chlamydia*^{22,28}.

C. trachomatis, através de seus sorotipos, pode causar doenças em adultos, crianças e neonatos de ambos os sexos, sendo os quadros clínicos superficiais ou profundos, promovendo algumas vezes seqüelas graves e irreversíveis²⁵.

Vários métodos estão disponíveis para a detecção de *C. trachomatis* em amostras de material biológico através de exame direto (Giensa), cultura de células, imunofluorescência direta, métodos imunoenzimáticos e os métodos de amplificação de ácidos nucleicos. A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por bactérias do gênero *Chlamydia* em função da rapidez e sensibilidade e por não depender da viabilidade da amostra^{3,6,20,27}.

A grande vantagem de técnicas de amplificação do DNA é a sensibilidade (98% a 99% em relação aos demais métodos) e a possibilidade de se utilizar urina para a detecção de DNA de clamídia¹. O teste COBAS – Amplicor *Chlamy-*

dia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems) é um teste qualitativo *in vitro* para detecção de *C. trachomatis* em urina de indivíduos de ambos os sexos e em amostras de secreção endocervical e uretral. Este teste consiste de um ensaio multiplex que permite a amplificação simultânea de DNA alvo de *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, além de um controle interno. Para a identificação de *C. trachomatis* o teste baseia-se na amplificação de ácidos nucleicos por Reação em Cadeia da Polimerase usando oligonucleotídeos biotinizados, hibridização de ácidos nucleicos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica¹. A seqüência alvo que é amplificada corresponde a 207 pb de parte do gene de virulência que codifica uma Integrase e está presente em um plasmídeo críptico que tem 7,8 kb e ocorre em aproximadamente 10 cópias por célula da bactéria *C. trachomatis*. A identificação de um alvo plasmidial aumenta a sensibilidade do método comparado com o uso de alvos cromossômicos de cópia única, como por exemplo o gene *omp1*¹³.

As infecções causadas por *C. trachomatis* são freqüentes, assintomáticas e com complicações relacionadas com infertilidade em um grande número de casos. Os métodos de detecção mais utilizados são complexos e laboriosos. A aplicação e validação de métodos moleculares favorecem o diagnóstico rápido e preciso. O objetivo deste trabalho foi validar o método de PCR – em tempo real para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de urina e secreção endocervical e uretral, usando o método de PCR COBAS – Amplicor® *Chlamydia trachomatis* test (Roche Diagnostic Systems) como ferramenta de controle e comparação nos experimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram utilizadas 136 amostras obtidas de pacientes submetidos a exame de detecção de *Chlamydia trachomatis* no Laboratório Álvaro S/A. Estas amostras foram oriundas de secreção endocervical, secreção uretral e urina. Swabs endocervical e uretral foram coletados em kits fornecidos pelo Laboratório Álvaro com meio de transporte apropriado para *Chlamydia trachomatis* (tampão), as urinas foram coletadas em frascos estéreis, urina de primeiro jato. As amostras foram armazenadas a temperatura de 2 - 8°C e os exames foram realizados em intervalo máximo de 48h.

PCR

A PCR foi realizada usando o kit de diagnóstico COBAS – Amplicor *Chlamydia trachomatis* test (Roche Diagnostic Systems) utilizando a amostra de acordo com as instruções do fabricante. Para amostras endocervical e uretral, foi adicionado 1 mL do diluente (tampão Tris-HCL, 6Mm de Cloreto de Magnésio, detergente e azida sódica), os tubos foram misturados e agitados em vortex, em seguida incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, 50 mL da amostra foi adicionado a cada tubo de PCR que contem 50 mL da mistura para *Chlamydia*. Essa mistura contém oligonucleotídeos biotinizados (ct-cp24: GGATTCCTGTAACAACAAGTCAGG e ct-cp27: CCTCTTCCCCAGAACAATAAGAACAC) que amplificam uma seqüência plasmidial de 207 pb de *C. trachomatis*. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems. Após a amplificação, as misturas de PCR foram desnaturadas com uma

solução de hidróxido de sódio e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida 25 mL da mistura foi adicionada a uma microplaca revestida com sondas oligonucleotídicas específicas para *C. trachomatis* conjugadas a biotina. Após 1h de incubação a 37°C, as placas foram lavadas para remover as sondas não aderidas e uma solução Avidina - Peroxidase de Rábano Silvestre foi adicionada. Depois a placa foi incubada por 15 minutos a 37°C, e lavada. O conjugado Avidina - Peroxidase se fixa ao amplicom marcado com biotina que foi hibridizado pelas sondas oligonucleotídicas que se encontram fixas à placa. A placa é lavada novamente para remover o conjugado não fixo e uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5' - tetrametilbenzina (TMB) é adicionada aos reservatórios. A peroxidase de rabano silvestre catalisa a oxidação de TMB em um composto colorido. A reação é interrompida pela adição de um ácido fraco, sendo determinada a absorbância em $\lambda=450$ nm através de um leitor automatizado para microplacas (Leitor Bio-Tek, modelo ELx800).

PCR em tempo real

As amostras foram submetidas à extração de DNA total usando o kit comercial Qiagen (QIAamp[®] DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook) seguindo as recomendações do fabricante

Na técnica de amplificação de ácidos nucleicos em tempo real foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ct-cp24 e ct-cp27, ou seja, os mesmos aplicados com o Kit de diagnóstico COBAS – Amplicor(*Chlamydia trachomatis*/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems). A reação de PCR foi executada em um volume total de 25µl, a mistura contém 5µl de DNA, 12,5µl de SYBR Green I (Taq- polimerase, tampão, dNTP's e o corante SYBR Green; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 0,5µl de cada primer e 6,5µl de água deionizada. A amplificação e a detecção do material foi feita em termociclador Real Time Applied Biosystems usando o seguinte programa, 95° C por 5 minutos, seguida de 49 ciclos (95°C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto) e 72° C por 10 minutos. Os produtos obtidos foram também analisados em eletroforese com gel de agarose a 2%. Os resultados da análise foram comparados com o Kit de diagnóstico COBAS – Amplicor(*Chlamydia trachomatis*/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems (Roche).

RESULTADOS

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo. As infecções podem afetar os olhos, os pulmões, ou a área urogenital, dependendo da idade da pessoa infectada e como a infecção é transmitida. As secreções endocervical e uretral e a urina podem facilmente ser selecionados para detecção de *C. trachomatis*. Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos são considerados atualmente como os métodos mais sensíveis para detecção do patógeno.

Foram analisadas e comparadas 136 amostras para a detecção de *C. trachomatis*. Deste grupo, 61 swabs de secreção endocervical, 14 de secreção uretral, e 61 amostras de urina. Neste trabalho foram consideradas verdadeiramente positivas (VP) ou verdadeiramente negativas (VN) as amostras identificadas com o teste de diagnóstico COBAS - Amplicor((Roche), usado como padrão ouro. A PCR em tempo real e o teste COBAS - Amplicor((Roche) foram igualmente sensíveis para diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de secreção uretral (Tabela 1). Entretanto, em amostras de

urina e secreção endocervical o teste COBAS - Amplicor((Roche) mostrou 57% e 33% de positividade, respectivamente, contra 47% e 24% de positividade, obtidos para as mesmas amostras com a PCR em tempo real (Tabela 1).

Diagnósticos de *C. trachomatis* a partir de amostras de urina e secreção têm sido comparados por diferentes autores, e demonstram que a sensibilidade de identificação de *C. trachomatis* por PCR em tempo real em amostras endocervicais é ligeiramente maior do que aquela obtida em amostras de urina^{23,7}. Neste trabalho nós mostramos que o teste em validação apresentou uma sensibilidade de 85% para amostras de urina, 80% para amostras de secreção endocervical e 100% para amostra de secreção uretral, comparando com o nosso padrão ouro, mostrando que a sensibilidade alcançada com o método é uma sensibilidade apropriada para fins diagnósticos (Tabela 2) já que a sensibilidade dos testes considerados de não amplificação de ácidos nucleicos (cultura de células, imunofluorescência direta, métodos imunoenzimáticos e exame direto) é menor¹⁰. A característica comum entre os testes de amplificação de ácidos nucleicos é que este está projetado para amplificar as seqüências dos ácidos nucleicos que são específicas para o organismo que está sendo detectado. Diferente dos outros métodos diagnósticos presentes na rotina clínica, os testes de amplificação não requerem organismos viáveis. A sensibilidade aumentada desses testes é atribuída a sua habilidade de produzir um sinal de amplificação mínimo a partir de uma única cópia do DNA do alvo ou do RNA¹⁰. Verifica-se também uma especificidade de 100% em um valor preditivo positivo de 100% para os diferentes materiais clínicos estudados (Tabela 2).

TABELA I
Percentagem de amostras positivas e negativas de acordo com o método utilizado e a espécie clínica.

Amostra	COBAS Amplicor [®] (Roche)		PCR em tempo real		Total de amostras
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Urina	35 (57%)	26 (43%)	29 (47%)	32 (53%)	61 amostras
Secreção Endocervical	20 (33%)	41 (67%)	15 (24%)	46 (76%)	61 amostras
Secreção uretral	7 (50%)	7 (50%)	7 (50%)	7 (50%)	14 amostras

TABELA II
Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do PCR em Tempo Real.

Método utilizado	Tipo de amostra	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
PCR em tempo real	Urina	85%	100%	100%	81%
	Secreção endocervical	80%	100%	100%	89%
	Secreção uretral	100%	100%	100%	100%

DISCUSSÃO

A maior dificuldade no diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis* é o caráter assintomático desta. A escolha da PCR na detecção de *C. trachomatis* em amostras clínicas está fundamentada na maior sensibilidade e especificidade de métodos de biologia molecular frente aos métodos de imunodeteção². Comparados ao isolamento do

patógeno em cultivo celular, os métodos moleculares são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade¹⁰, além de não exigirem cuidados de armazenamento para conservar a viabilidade das amostras³.

A amplificação de DNA, na detecção de *C. trachomatis* é o método de eleição por sua maior sensibilidade⁹, especialmente quando dirigida ao plasmídeo críptico da bactéria presente em 7 a 10 cópias por célula¹³. A vantagem da PCR em tempo real em relação a PCR COBAS Amplicor® que é qualitativa, é a facilidade de quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação¹⁵. No presente trabalho nós obtivemos menor sensibilidade do método de PCR em tempo real para identificação de *C. trachomatis* nas amostras de secreção endocervical e urina. Isto poderia estar relacionado ao maior número de passos pré-analíticos utilizados na análise. Já que o teste COBAS - Amplicor® (Roche) é padronizado para análise de material clínico direto, na PCR em tempo real as amostras de DNA plasmidial foram extraídas usando um kit de extração de DNA total (Qiagen). A utilização de um kit de extração de DNA plasmidial seria mais recomendada neste caso, seguida de análise por PCR em tempo real. Entretanto, dados da literatura mostram que variantes livres do plasmídeo de *C. trachomatis* podem ser encontradas em amostras clínicas e estas não podem ser detectadas se apenas o DNA plasmidial bacteriano for usado para amplificação do DNA alvo³. Assim, para eliminarmos possibilidades de resultados falsos negativos utilizamos um método de extração de DNA total das amostras clínicas.

Uma outra vantagem a ser destacada, é a habilidade dos testes de amplificação de ácidos nucleicos de detectar *C. trachomatis* em amostras de fácil coleta, como a urina, eliminando a necessidade de técnicas invasivas para a obtenção do material clínico. Uma desvantagem desta técnica é que as amostras podem conter inibidores da amplificação levando a obtenção dos resultados falso-negativos. Assim, a padronização da metodologia e o uso de controles são indispensáveis ao processo.

Na validação do método de PCR em tempo real para *C. trachomatis*, obtivemos 85% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparada com o PCR COBAS - Amplicor® (Roche) sugerindo que ambas as técnicas são altamente eficazes e confiáveis para diagnosticar esse patógeno, podendo oferecer a clínicos uma indicação mais clara para o tratamento da infecção.

REFERÊNCIAS

1. AMPLICOR Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) Test (Roche). Roche Molecular Systems, 2003.
2. An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, Weisburg WG, Klinger JD, Olive DM. Infection with a plasmid-free variant Chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. J Clin Microbiol. 1992; 30 (11):2814-2821.
3. Black, Carolyn M. Current Methods of Laboratory Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections. Clin. Microbiol. Rev., 10(1): 160-184, 1997. (12)
4. Boel, C. H. E. et al. Evaluation of Conventional and Real-Time PCR Assays Using Two Targets for Confirmation of Results of the COBAS AMPLICOR Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae Test for Detection of Neisseria gonorrhoeae in Clinical Samples. J. Clin. Microbiol., 43(5): 2231-2235, 2005. (4)
5. Chan EL; Brandt K; Stoneham H; Antonishyn N; Horsman GB (2000). Comparison of the effectiveness of polymerase chain reaction and enzyme immunoassay in detecting Chlamydia trachomatis in different female genitourinary specimens. Archives of pathology & laboratory medicine; Vol. 124 (6); 840-3.
6. Chan, E. L. Laboratory testing for Chlamydia trachomatis urogenital infections. The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care 2002; 28 (3): 153-154.
7. Cook, R. L. et al. Systematic Review: Noninvasive Testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Annals of Internal Medicine, 142(11): 914-924, 2005. (7)
8. Eickhoff, M. et al. Ultra-Rapid Detection of Chlamydia trachomatis by Real-Time PCR in the LightCyclerR using SYBR Green Technology or 5'-Nuclease Probes. ClinLab 2003; 49: 217-225 (8)
9. Johnson Re, Green Ta, Schachter J, Jones Rb, Hook Ew, Black Cm, Martin Dh, St Louis Me, Stamm We. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men. J. Clin. Microbiol., 38: 4382-4386, 2000.
10. Johnson Re, Newhall Jw, Papp Jr, Knapp Js, Black Cm, Gift Tl, Steece R, Markowitz Lf, Devineo J, Walsh Cm, Gunter Dc, Irwin Kl, Lisle S, Berman Sm. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections. MMWR 2002, 51(No.RR-15): 1-38.
11. Johnson, S. J. et al. Semiautomation of Nucleic Acid-based Assays for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Clin Chem 2001 47: 760-763. (6)
12. Keegan et al. Validation of a Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis in Cervical PreservCyt Samples. Clin Chem.2005; 51: 1301-1302. (3)
13. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assay for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. J Clin Microbiol 1993, 31: 1753-1758).
14. Murray, P. R. et al. Microbiologia Médica, 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 302-308.
15. Novais CM, Pires-Alves M & Silva FF. PCR em tempo real. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2004, 33:10-13.
16. Persing Dh. Target selection and optimization of amplification reactions. In: Diagnostics molecular microbiology principles and applications. ASM, Washington, p.88-104, 1993.
17. Pourahmadia, F. et al. Toward a Rapid, Integrated, and Fully Automated DNA Diagnostic Assay for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Clinical Chemistry 46: 1511-1513, 2000; (9)
18. Quinn, T. C. et al. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachomatis Infection in Urine Samples from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. J. Clin. Microbiol., 34(6): 1401-1406, 1996. (1)
19. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2003. (10)
20. Seadi, C. F. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas. J. Brás. Patol. Méd. Lab. Vol. 38 no 2, 2002.
21. Schachter J, Stamm W E. In: Murray PR, editors Manual of Clinical of Microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA 1999: 795-806).
22. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. Journal of Bacteriology, 1987; 169:3879-3885
23. Sugunendran H; Birley HD; Mallinson H; Abbott M; Tong CY (2001) Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital Chlamydia trachomatis infection in male patients. Sexually transmitted infections; Vol. 77 (6); 423-6
24. Tan, H. H, Chan, R. Use of polymerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect Chlamydia trachomatis infections in female sex workers in Singapore. Singapore Med. J. 2005; 46(5):215. (11)
25. Tortora, G. J. et al. Microbiologia, 6ª ed. São Paulo: Artmed, 2000, 575-700.
26. Toye, B. et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections in Asymptomatic Men and Woman by PCR Assay. Clin. Microbiol. . Rev., 34(6): 1396-1400, 1996. (2)
27. Veronesi, R. Focaccia, R. Tratado de Infectologia, 2ª ed. Atheneu, 2002, 561-569.
28. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell HD. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia trachomatis serovars. Infect Immun 1989; 1040-1049)

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Perfil dos casos de meningite bacteriana e viral na região do Alto Uruguai, RS*

The profile of the cases of bacterial and viral meningitis at Alto Uruguay region, RS

Darieli Alves Moreira¹, Carla Caprini Totti¹, Viviane Câmara dos Reis²,
Vanusa Manfredini³ & Luciane C Mylius⁴

RESUMO - As meningites consistem no comprometimento infeccioso do SNC e das meninges por microrganismos patogênicos. Constituem um sério problema em saúde pública, sendo uma importante causa de mortalidade. Este trabalho trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, de delineamento transversal, cujo objetivo foi traçar o perfil dos casos de meningite, na região do Alto Uruguai, durante o período de 2000 a 2006, enfatizando a análise das alterações líquóricas e os sinais clínicos que caracterizam os casos de meningite viral e bacteriana. Para isso, os dados foram obtidos das fichas de notificação fornecidas pela 11ª CRS correspondentes ao período de análise. Foram identificados 33 pacientes com diagnóstico de meningite, havendo a prevalência da etiologia não-identificada, com 40% de incidência. Observou-se a prevalência do sexo masculino em 70% e a idade média de 17 anos sendo, a distribuição percentual dos pacientes com meningite viral e bacteriana em relação à faixa etária, com maior frequência em indivíduos acima de 10 anos. A prevalência de febre, seguida de cefaléia e vômito constituem a tríade da meningite. Também, constatou-se que as características líquóricas seguem um padrão bem definido para as meningites bacteriana e viral, reforçando a necessidade de estudos mais abrangentes em diferentes regiões e com maior periodicidade, a fim de se evitar que esta doença volte a promover a mortalidade da população.

PALAVRAS-CHAVE - meningite bacteriana, meningite viral, saúde pública.

SUMMARY - The meningitis consists of an infectious danger of the CNS and also the meninges by pathogenic microorganism. They constitute serious problem in public health, being an important cause of mortality. This is an observational and retrospective study of transversal line, which objective was to trace the profile of the cases of meningitis at Alto Uruguay region during the period of 2000 to 2006, emphasizing the analyzes of liquor alterations and the clinic signals which characterize the viral and bacterial meningitis. For that reason the data was collected from the notification form supplied by 11° CRS corresponding to the analyzed period. It was identified 33 patients with meningitis diagnosis; there was the prevalence of non-identification etiology, with 40% of incidence. It was observed the prevalence of the male 70% and the average of age was 17 years old in the identified cases, being the average of the patients with viral and bacterial meningitis in relation to the age, bigger in the age of 10 years old. The prevalence of fever, followed by cephalic and vomit which constitute the triad of the meningitis. It was also observed that the liquor which characteristic follows a defined pattern for the bacterial and viral meningitis, reinforcing the necessity of more widely studies in different regions and with more frequently, so that it can be avoided and this sickness does not back to promote the population's mortality.

KEYWORDS - bacterial meningitis, viral meningitis, public health

INTRODUÇÃO

A meningite consiste basicamente na ocorrência de um processo infeccioso ou não das meninges.⁴ Essa doença pode ser de evolução aguda; particularmente causada por bactérias (principalmente a *Neisseria meningitidis* (*meningococo*), *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*), vírus (Enterovírus, Arbovírus, Vírus da Caxumba e outros) ou de evolução crônica, quando produzida por protozoários, espiroquetas, helmintos, fungos ou micobactérias.²¹ A doença meníngea é uma síndrome que se caracteriza por: febre, cefaléia intensa, vômito e sinais de irritação nas meninges (rigidez de nuca, sinal de Kerning, sinal de Brudzinski, sinal de Laséque), acompanhadas de alterações do líquido cefalorraquidiano (LCR).⁶ Esta doença está relacionada com uma série de complicações tanto imediatas quanto tardias, que podem culminar com danos irreversíveis ao Sistema Nervoso Central (SNC) ou levar ao óbito.²² Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), durante a década de 90, foram notificados em média 28 mil casos por ano de meningites de todos os tipos no Brasil.⁶ No entanto, as taxas de mortalidade desta patologia variam, amplamente, desde 2% em crianças até 20 a 30% em neonatos e adultos.¹¹ O processo inflamatório da meningite ocorre dentro do espaço subaracnóideo, que é ocupado pelo LCR.⁴ Este líquido consiste num sistema fisiológico destinado a distribuir nutri-

entes pelo tecido nervoso, retirar resíduos metabólicos e servir de barreira mecânica para o amortecimento dos traumas que atingem o encéfalo e a medula.⁵ Desta forma, é considerado o melhor elemento para a pesquisa diagnóstica de meningite, pois participa ativamente na resolução do processo infeccioso, seja facilitando o transporte de elementos imunitários sangüíneos às meninges e ao SNC, seja veiculando antimicrobianos administrados terapêuticamente.²¹ As meningites de origem infecciosa, causadas por vírus e bactérias são as mais frequentes do ponto de vista de saúde pública, pela magnitude de sua ocorrência, potencial de transmissão, patogenicidade e relevância social.⁶ Dada a importância dos dados descritos sobre meningites no Brasil, sua repercussão nos serviços de saúde e a falta de trabalhos na região do Alto Uruguai (RS), verificou-se a necessidade de estudar a prevalência desta doença. As alterações líquóricas nos casos notificados desta região fundamentam e aprimoram propostas de controle e monitoramento mais adequados, uma vez que o problema das meningites continua sendo uma questão séria em saúde pública.

OBJETIVO

Traçar o perfil dos casos de meningite na região do Alto Uruguai, que compreende 31 municípios, ao norte do Estado do Rio Grande do Sul, durante o período de 2000 a 2006,

Recebido em
Aprovado em

Este trabalho foi realizado junto a 11ª Coordenadoria Regional de Saúde/RS e Laboratório de Análises Cito-hematológicas e Microbiológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

¹Farmacêutica bioquímica

²Farmacêutica, aluna da ênfase em Análises Clínicas da UFRGS,

³Professora titular da disciplina de Citologia Clínica da URI - Erechim

⁴Professora titular da disciplina de Análises Citológicas da UFRGS.

ênfatizando a análise das alterações líquóricas e os sinais clínicos que caracterizam os casos de meningite bacteriana e viral ocorridos nesta região.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenhado de forma observacional, retrospectivo e de delineamento transversal. Os dados foram obtidos pelas fichas de investigação de meningite, fornecidos pela 11ª Coordenadoria Regional de Saúde (CRS), notificados durante o período de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2006. A partir destas, fichas foram analisados os seguintes sinais e sintomas clínicos: febre, cefaléia, vômitos, convulsões, rigidez de nuca, abaulamento de fontanela, e os sinais de Brudzinski e Kerning. Todos os pacientes foram sujeitos à punção lombar e a análise citológica do líquido. Realizou-se contagem total e diferencial de leucócitos e hemácias, como também, foram determinadas glicemia e proteínas totais.

Adotou-se como critério para o diagnóstico das meningites: **Bacteriana:** pleocitose (em geral acima de 1000 células / mm³, podendo apresentar valores inferiores, como na meningite meningocócica ou em fase inicial da meningite) com predomínio de neutrófilos, proteínas elevadas (em geral > 100 mg/dL), glicorraquia (< 40 mg/dL ou relação glicorraquia / glicemia < 0,3) e a análise bacteriológica incluiu a bacterioscopia pelo Gram e a cultura do LCR.

Viral: pleocitose (de 10 a 200 células / mm³) com predomínio de linfomonócitos, glicorraquia normal (> 45 mg/dL ou relação glicorraquia / glicemia > 0,6), proteínas normais (< 40 mg/dL) ou discretamente aumentadas, com ausência de bactérias na bacterioscopia e cultura de LCR negativa. Como critério de confirmação de meningite viral foi utilizada a citoquímica.

Os dados colhidos foram analisados com o programa Microsoft Excel e os gráficos no Microsoft Word.

RESULTADOS

No período de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2006 foram identificados 33 casos de meningite notificados pela 11ª Coordenadoria de Saúde, na região do Alto Uruguai. Destes, 13 casos (40%) de meningite de etiologia não especificada, 10 casos (30%) de etiologia bacteriana, 8 casos (24%) de etiologia viral e 2 casos (6%) de outras etiologias (Figura 1). Em relação ao sexo dos pacientes com meningite ocorridos na região do Alto Uruguai, verificou-se que dos 33 (100%) casos notificados, 23 (70%) pertenciam ao sexo masculino e, 10 (30%) pertenciam ao sexo feminino.

A idade dos pacientes analisados apresentou uma média de 17 anos. Observou-se que existiram mais casos de meningite em pacientes com idade superior a 10 anos, 26 casos (78%) e, em menor proporção, na faixa etária de 1 a 10 anos, 7 casos (22%). A distribuição percentual dos pacientes com meningite bacteriana em relação a faixa etária foi de 8 (80%), em indivíduos maiores de 10 anos, e 2 (20%), em idade, entre 1 e 10 anos. Já nos casos de meningite viral, observou-se que a percentagem dos casos com idade superior a 10 anos foi de 5 (62%) e 3 (38%) em indivíduos com faixa etária de 1 a 10 anos.

A taxa de mortalidade apresentada, em relação ao total de casos de meningite notificados, foi de 3 casos (9%). Destes, 1 caso (33%) foi decorrente de meningite de etiologia não-especificada e 2 casos (67%) de meningite bacteriana por *Streptococcus pneumoniae*.

Os sinais clínicos dos casos em análise foram investigados de acordo com a presença dos mesmos em cada caso e distribuídos em percentagem. Entre os sinais e sintomas clínicos mais frequentes destacam-se: febre, cefaléia, vômito, rigidez de nuca e outros não especificados. Em menor frequência, observou-se crises convulsivas, sinais de Kerning/Brudzinski, petéquias e o coma (Figura 2).

A análise citológica do LCR, dos casos de meningite de origem infecciosa causada por vírus e bactérias, que são os agentes etiológicos mais frequentes em saúde pública, mostrou ser um elemento de grande importância para o diagnóstico e o esclarecimento da síndrome meníngea (Figuras 3 e 4).

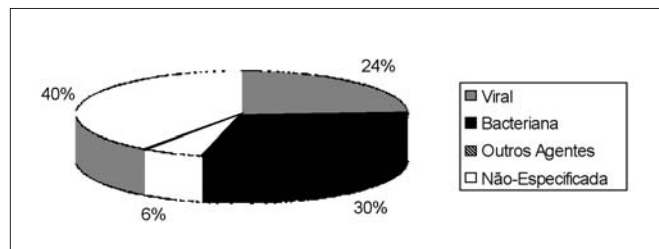


Figura 1: Percentagem dos tipos de meningites notificadas pela 11ª Coordenadoria de Saúde do Alto Uruguai durante o período de 2000 a 2006.

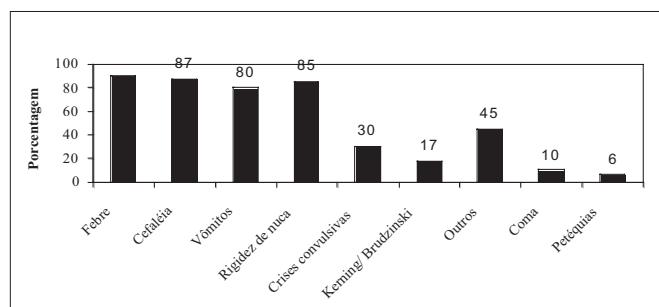


Figura 2: Distribuição dos sinais e sintomas clínicos dos casos de meningite na região do Alto Uruguai.

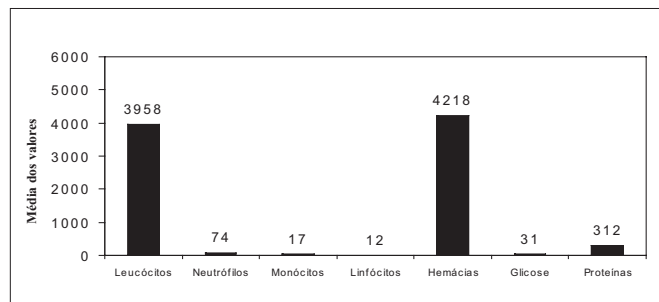


Figura 3: Distribuição da média dos valores obtidos de acordo com a análise citológica e bioquímica do LCR de pacientes com meningite bacteriana.

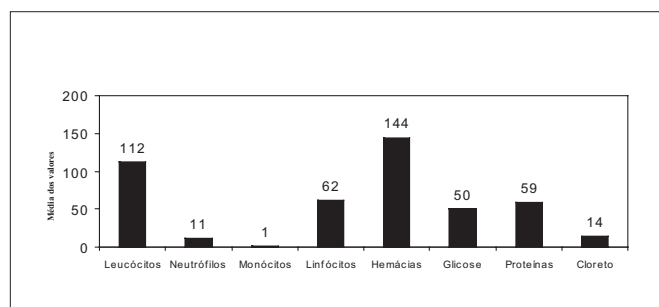


Figura 4: Distribuição da média dos valores obtidos de acordo com a análise citológica e bioquímica do LCR de pacientes com meningite viral.

DISCUSSÃO

A etiologia mais freqüente das meningites em todo o mundo é a viral.¹⁴ No entanto, o predomínio de meningite de etiologia não-especificada, em 40% dos casos deste estudo, enfatiza a necessidade de observar os procedimentos de coleta, transporte e/ou processamento do LCR, uso de medicamentos antes da punção, falta de acesso a serviços de saúde adequados ou à sensibilidade das técnicas utilizadas para a identificação dos agentes etiológicos. Outro estudo também relata esse fato.²⁰ Dessa forma, tal resultado pode refletir problemas no processo de assistência e exercer efeito negativo sobre o prognóstico da doença.³

O predomínio evidenciado do sexo masculino em relação ao feminino coincide com dados existentes na literatura.^{18,8,7} Essa prevalência, de acordo com Martinello e colaboradores (2005),¹¹ parece estar relacionada a uma base genética implicada na susceptibilidade desse gênero à infecções.

No Brasil, segundo Santos e Netto (2005),¹⁶ as meningites ocorrem com grande freqüência e atingem, principalmente, crianças de menor idade. No entanto, a baixa prevalência de meningites, principalmente a bacteriana, em crianças na região do Alto Uruguai, pode estar relacionada à eficácia da vacinação, principalmente quando há uma situação suspeita e, também, pode refletir a qualidade da assistência prestada pela vigilância epidemiológica e pelas unidades prestadoras de assistência nessa região.

Com o advento da terapêutica, a letalidade das meningites decresceu de um índice de 90% para um nível em torno de 10 a 20%, o qual permanece atualmente.¹⁸ Dessa forma, a taxa de mortalidade de 9% encontrada no presente estudo é condizente com a taxa de mortalidade relatada na literatura.

Os sintomas mais freqüentes associados à meningite são a clássica tríade: febre, vômito e cefaléia.¹¹ Segundo Romaneli e colaboradores,⁵ em trabalho publicado (2002), a febre é o sintoma mais freqüente e consistente em casos de meningite, aparecendo em 76 a 100% dos casos. De acordo com Martinello e colaboradores (2005),¹¹ a rigidez de nuca é encontrada em mais de 50% dos pacientes e é um sinal patognômico de irritação meníngea e de grande valor diagnóstico de meningite. Também relataram que as crises convulsivas podem estar presentes em 20 a 30% dos pacientes.

Entretanto, Trocôli em 1998,²⁰ observou que 70,2% dos casos do seu estudo apresentaram apenas rigidez de nuca, ou tiveram a presença de rigidez de nuca, sinais de Kernig e Brudzinski, sendo que a presença de um destes dois últimos sinais de forma isolada foi mínima, exatamente como o observado no presente trabalho. Dessa forma, o perfil dos casos de meningite analisados neste estudo, corrobora o achado de outros autores.¹⁰

O exame do LCR vem sendo usado como diagnóstico desde o final do século XIX, contribuindo significativamente para confirmação de patologias neurológicas.⁶ Os testes realizados no LCR, se corretamente interpretados, podem fazer do mesmo uma ferramenta de grande valor para o diagnóstico da síndrome meníngea.^{5,6}

Normalmente o LCR contém até 5 células/mm³, quase todas representadas por linfócitos.¹² A identificação etiológica das meningites não constitui tarefa de fácil execução, no entanto, após inúmeros estudos, pôde-se estabelecer alguns critérios para a identificação das meningites com ênfase para as etiologias bacteriana e a viral, as quais ainda constituem um sério problema de saúde pública.

Estudos como os de Lucena e colaboradores (2002),⁹ Campeãs e Campeãs (2003),² Tavares e Marinho (2005);¹⁹ utilizam como critérios para a meningite bacteriana a cultura,

coloração pelo método de Gram no LCR ou a celularidade ≥ 1000 células/mm³ com predomínio de neutrófilos, valores de glicose diminuídos, (≤ 45 mg/dL) e as proteínas com valores aumentados (> 45 mg/dL). É importante ressaltar que esses critérios foram observados neste estudo através da análise do LCR, os quais foram apresentados anteriormente.

No entanto, ressalta-se que os diferentes exames utilizados para a identificação no LCR mostraram que a maior parte dos pacientes, 8 (80%) com diagnóstico definitivo de meningite bacteriana, foi positiva em dois exames, com alta sensibilidade para o látex, quando comparado com a cultura, a qual foi usada como "padrão ouro". Entretanto, a maior especificidade foi o Gram.

Estes dados sugerem a importância da utilização de várias técnicas para aumentar a certeza diagnóstica desta patologia. Como critérios para o diagnóstico da meningite viral, os dados líquidos característicos incluem pleocitose (de 10 a 200 células/mm³) com predomínio de linfomononucleares.⁷ O exame precoce pode revelar um LCR acelular, ou seja, pode haver inicialmente predomínio de polimorfonucleares. Porém, essa característica não é duradoura.¹ Esta costuma regredir em poucos dias, dando lugar ao predomínio de mononucleares.¹³ Uma vez que os agentes virais não consomem glicose, a glicorraquia apresenta-se normal (> 45 mg/dL); da mesma forma, as proteínas encontram-se normais ou discretamente aumentadas.¹⁷ Também, na meningite viral há ausência de bactéria na bacterioscopia, cultura do líquido e o teste do látex é negativo.

É importante ressaltar que a confirmação do diagnóstico de meningite viral foi realizada através da citoquímica; no entanto, não foi possível realizar o diagnóstico etiológico dos casos desta patologia.

De acordo com o relato de outras pesquisas realizadas no Brasil, ainda são poucos os estudos sobre as etiologias em casos de meningites, muito embora exista a notificação e a investigação dos casos. Sabe-se, ainda, que é baixa a especificidade do diagnóstico etiológico, o que dificulta o conhecimento dos principais causadores das meningites. Diante da necessidade de diagnóstico dos agentes etiológicos desta patologia, sugere-se a realização de trabalhos mais abrangentes em diferentes regiões e com maior periodicidade, para evitar que esta doença continue com alta mortalidade na população.

AGRADECIMENTO

A realização do trabalho só foi possível graças ao empenho da funcionária Sandra da 11ª Coordenadoria Regional de Saúde/RS que não mediu esforços em nos repassar as fichas de notificação dos casos durante o período descrito.

REFERÊNCIAS

- 1) Bottner, A.; Daneschnejad, S.; Handrick, W.; Schuster, V.; Liebert, U. G.; Kiess, W. A station of the meningite aseptic in Germany: epidemiological, clinical and diagnostic aspects. *Pediatric Infectious Diseases*. 21, 12: 1126-1132, 2002.
- 2) Campeãs, A. E.; Campeãs, M. V. S. Meningite Bacteriana. *Rev. Prática Hosp*, 5, 27, 2003.
- 3) Escosteguy, C. C.; Medronho, R. A.; Madruga, R.; Dias, H. C.; Braga, R. C.; Azevedo, O. P. Vigilância epidemiológica e avaliação de assistência às meningites. *Revista de Saúde Pública*, 38, 5: 12-14, 2004.
- 4) Ferreira, W. F.; Ávila, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001, 202-213.
- 5) Gassen, L.; Mylius, L. C. Meningites agudas: aspectos fisiopatológicos e aná-

- lise laboratorial do líquido cefalorraquidiano. *Revista de Pesquisa Médica*, 32, 2: 33-40, 1998.
- 6) Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. Rev. Ampl.; 2, Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006.
 - 7) Lamarão, M. L.; Gomes, C. L.M.; Ferreira, A. L. L.; Fonseca, M. C.; Araújo, C. B. L.; Santana, B. M.; Tavares-Neto, J. Pesquisa de enterovírus em casos de síndrome de meningite asséptica em Belém, PA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 5: 391-395, 2005.
 - 8) Lee, Y. K.; Burger, D.; Lee, S.H.; Hong, H. J.; Kang, H. J. Epidemiology in change of the meningitides aseptic pediatric in Daejeon, Coreia of 1987 the 2003. *BMC Infectious Diseases*, 5, 97-110, 2005.
 - 9) Lucena, R.; Gomes, I.; Cardoso, E.; Góes, J.; Nunes, L.; Cardoso, A.; Rodrigues, B.; Souza, M.; Novais, M. A.; Melo, A. Aspectos clínicos e laboratoriais de meningite piogênica em lactentes. *Arquivo de Neuro-Psiquiatria*, 60, 2: 258-261, 2002.
 - 10) Marchanda, V.; Gupta, S.; Bhalla, P.; Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J. Med. Microbiol*, 24, 1: 7-19, 2006.
 - 11) Martinello, C.; Lazaretti, A. S.; Reginato, F. P.; Pereira, C. S. Meningite aguda em crianças no Hospital São Vicente de Paulo. *Rev. Méd. HSVP*, 17, 36: 16-20, 2005.
 - 12) Motta, V. T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório- Princípios e Interpretações*. 4º ed. Porto Alegre: Ed. Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS- Caxias do Sul, 2003.
 - 13) Negrini, B.; Kelly, M. D.; Kelleher, J.; Wald, R. Findings fluid cerebrospinal in aseptic against bacterial meningite. *Pediatrics*, 105, 2: 316-319, 2000.
 - 14) Rotbart, H. A. Viral Meningitidis. *Seminars in Neurology*, 20, 3: 15-22, 2000.
 - 15) Romanelli, R. M. C.; Kupek, E.; Bertoncini, R. C. C. Controle de surto de meningite meningocócica do sorogrupo C no município de Corupá, Santa Catarina, Brasil, com ações rápidas e efetivas de vigilância epidemiológica e imunização. *Caderno de Saúde Pública*, 20, 6: 1764, 2004.
 - 16) Santos, M. L.; Netto, A. R. Doença meningocócica: situação epidemiológica no município de Manaus, Amazonas. Brasil, 1998/2002. *Caderno de Saúde Pública*, 38, 5: 664-670, 2004.
 - 17) Sethi, K. N.; Favate, A.; Karter, D. Mollaret's meningitis in association with Herpes simplex virus type 2. *The internet Journal of infectious Diseases*, 4, 32: 247-248, 2005.
 - 18) Silva, R. H.; Ajura, M. G. ; Tavares-Neto, J.; Gomes, C. L. M.; Linhares, C. A.; Vasconcelos, F. C. P.; Ko, I. A síndrome da meningite asséptica por enterovírus de *Leptospira* sp em crianças de Salvador, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35, 2: 159-165, 2002.
 - 19) Tavares, W.; Marinho, L. A. C. Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. São Paulo: Atheneu, 2005, 750-764.
 - 20) Trocôli, M. G. C. Epidemiologia das meningites bacterianas e virais agudas ocorridas no Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS). 1997-1997. 114f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, 1998.
 - 21) Veronesi, R.; Focaccia, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996, 1, cap. 66.1: 827-843.
 - 22) Vieira, J. F. S. Incidência de meningite em pacientes de 0-12 anos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus. *Arquivo de Neuropsiquiatria*, 59, 2A: 249-255, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDENCIA:

Importância da identificação das mutações do proto-oncogene RET e sua atuação no desenvolvimento dos diversos fenótipos das neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2*

Importance of RET proto-oncogene mutations identification and its performance in the development of the multiples endocrines neoplasias type 2 several phenotypes

Vanessa Cristina de Oliveira¹; Willian Pedrosa de Lima²; Frederico Scott Varela Malta³; Victor Cavalcanti Pardini⁴ & Alessandro Clayton de Souza Ferreira⁵

RESUMO - A hereditariedade autossômica dominante da neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM 2) relaciona-se à ativação do proto-oncogene RET, através de mutações *missense*. As mutações do RET são encontradas em 95% dos casos índices de NEM 2 e apresentam relação direta entre sua localização codon específica e os diversos fenótipos desenvolvidos, dentre eles, carcinoma medular da tireóide, feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo. Baseando-se em análises bioquímicas e genéticas, é possível efetuar um diagnóstico prematuro, viabilizando a intervenção cirúrgica em tempo hábil. A periodicidade da monitorização bioquímica é ditada pelo fenótipo presente, pelas manifestações clínicas familiares e pelo genótipo RET. A recomendação da análise genética deve ser feita a todos indivíduos afetados e também a seus ascendentes e descendentes diretos, caso alguma mutação esteja presente; permitindo identificar os portadores de mutações RET, previamente ao início da sintomatologia. Neste trabalho, serão discutidos os aspectos moleculares dos diversos fenótipos da NEM 2, bem como a importância da identificação genotípica do proto-oncogene RET e sua interação com os testes bioquímicos visando o diagnóstico precoce, prevenção, monitorização, *screening* familiar e, portanto, maior sobrevida do paciente.

PALAVRAS-CHAVE - Proto-oncogene RET, NEM 2A, NEM 2B, CMT, Análise genética.

SUMMARY - The dominant autosomic heredity of the multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) is related to RET proto-oncogene activation, through mutations *missense*. RET mutations are found in 95% of MEN 2 index cases and present direct relation between its specific localization codon and the diverse developed phenotypes, among them, medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma and/or hyperparathyroidism. Being based on biochemists and genetics analyses, it is possible to perform a premature diagnosis, making possible a surgical intervention in the right time. The biochemist monitoring regularity is determined by present phenotype, the familiar clinical manifestations and RET genotype. The recommendation of the genetic analysis must be made to all affected individuals and also their ascendants and descendants, in case some mutation is present, allowing to identify the RET mutations carriers previously to the beginning of the symptomatology. In this work, the molecular aspects of MEN 2 diverse phenotypes will be discussed, as well as the importance of the RET proto-oncogene genotypic identification and its interaction with the biochemists tests aiming the precocious diagnosis, prevention, monitoring, familiar screening e, therefore, the patient's longer survival.

KEYWORDS - RET proto-oncogene, MEN 2A, MEN 2B, MTC, Genetic analysis.

INTRODUÇÃO

As neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2 (NEM 2) são síndromes de câncer, que podem apresentar carcinoma medular da tireóide (CMT), feocromocitoma e/ou hiperparatireoidismo (HPT), o que justifica suas classificações conforme as manifestações clínicas presentes, em NEM 2A, NEM 2B e CMTF^{3,4,7} (Tabela 1). A agressividade do CMT difere entre estes subtipos, sendo que, em ordem crescente, CMTF < NEM 2A < NEM 2B¹. O desenvolvimento da NEM 2 está frequentemente relacionado à mutações distribuídas ao longo do proto-oncogene RET, que o tornam ativado permanentemente. Sendo assim, há uma forte associação entre o genótipo e o fenótipo da doença NEM 2^{4,7}.

O carcinoma medular da tireóide, responsável por 5 a 8% dos tumores malignos da tireóide, é um tumor da crista neural derivado das células C parafoliculares que produzem principalmente calcitonina, antígeno carcinoembrionário (CEA) e *calcitonin gene-related peptide* (CGRP)^{4,7}. O CMT pode ter origem esporádica (75 a 80%) ou hereditária (20 a 25%), com herança autossômica dominante. Quando hereditário, pode ocorrer isoladamente, caracteri-

zando o carcinoma medular da tireóide familiar (CMTF); como componente das síndromes de neoplasia endócrina múltipla tipo 2A e 2B ou ainda como outras formas hereditárias¹². CMT é a primeira manifestação neoplásica da NEM 2, devido a sua precocidade e alta penetrância (90%) e também a principal causa de morbidade¹.

O feocromocitoma é um tumor unilateral ou bilateral das células adrenais cromafins¹², produtor de catecolaminas e metanefrinas, as quais podem causar hipertensão, quando presentes em excesso no organismo¹. O hiperparatireoidismo (HPT) consiste na hiperatividade das glândulas paratireóides, provocando aumento da produção do hormônio da paratireóide e levando a sinais e sintomas decorrentes da hipercalcemia, hipercalcúria e osteoporose⁶.

O CMTF é caracterizado pela presença isolada de CMT em múltiplos membros da família (quatro ou mais). No entanto, há dificuldade de classificar famílias com um número pequeno de casos de CMT sem outros fenótipos, porque podem representar uma família com poucos casos ou uma família com NEM 2A sem manifestação de feocromocitoma ou HPT. CMTF é considerada a NEM 2 de menor agressividade e de idade de manifestação mais tardia^{4,7}.

Recebido em
Aprovado em

¹Instituto Hermes Pardini – Departamento de Genética Humana

²Farmacêutica Bioquímica - Departamento de Genética Humana

³Médico - Assessoria Médica Científica do Instituto Hermes Pardini

⁴Biólogo, Mestre em Genética - Departamento de Genética Humana

⁵Doutor em Endocrinologia e Diretor do Departamento de Genética Humana

⁶Farmacêutico Bioquímico, Mestre em Genética e Coordenador do Departamento de Genética Humana

A NEM 2A, forma mais comum da NEM (90% dos casos)⁴, surge freqüentemente entre os 30 e 50 anos. Inicialmente, há hiperplasia glandular que pode evoluir para adenomas³. Provém das mutações do RET que modulam a dimerização da proteína tirosino quinase, cujo resultado são diferentes fenótipos, que são denominados conforme as manifestações clínicas presentes^{9,12} (Tabela 2).

A neoplasia endócrina múltipla tipo 2B consiste numa variante extremamente agressiva (5% dos casos), que se manifesta por CMT em 90% dos casos, feocromocitoma em 50%, além de anormalidades de desenvolvimento, incluindo hábitos marfanóides (dedos e extremidades longas), ganglioneuromas na língua, lábios e olhos e distúrbios do trato gastrointestinal (diarréia, constipação, obstrução intestinal, etc)^{3,4,6,7}. O HPT está ausente, apesar de, ocasionalmente, ocorrer hiperplasia da paratireóide⁸. Além de ser o tipo de NEM 2 mais agressivo, sua idade de ocorrência é cerca de 10 anos mais precoce que NEM 2A^{3,4,6,7} e a incidência de mortes de pacientes jovens se deve às metástases do CMT⁸. Na NEM 2B, há alteração das propriedades catalíticas da proteína RET⁵.

A NEM 2, uma síndrome autossômica dominante com penetrância dependente da idade, está relacionada ao estado ativado do proto-oncogene RET, através de mutações *missense* localizadas principalmente nos exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16^{1,2,9}. As mutações do RET são encontradas em 95% dos casos índices de NEM 2, quando o *screening* genético é desenvolvido rigorosamente¹ e tem sido consideradas como a causa básica da NEM 2^{1,9}.

A forma de apresentação dos diversos fenótipos da NEM 2 está relacionada com a presença de determinadas mutações codon específicas. Com o desenvolver das pesquisas e da amplitude de alterações genéticas relacionadas, torna-se, muitas vezes, difícil acompanhar os avanços moleculares na área e direcioná-los a cada paciente em seu caráter particular. O intuito deste trabalho é oferecer uma atualização dos aspectos moleculares das neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2, bem como conscientizar sobre e apresentar a importância da identificação genotípica do proto-oncogene RET e o valor da interação desta com os testes bioquímicos. Desta maneira, espera-se contribuir para o diagnóstico precoce, a prevenção, a monitorização, o *screening* familiar e, portanto, para a maior sobrevida do paciente NEM 2 e sua família.

A GENÉTICA DA NEM 2

Proto-oncogene RET

O proto-oncogene RET (Rearranged during Transfection)^{4,13} é composto por 21 exons¹⁰, está localizado no cromossomo 10q11-q12³, e codifica um receptor de tirosina quinase nas células neuronais e neuroepiteliais^{1,4,7}. As funções do RET - crescimento, diferenciação ou resposta à sobrevida - em células normais e tumorais são mediadas por uma série de complexos, interligados por diversos receptores e substratos, que sofrem influência tanto das mutações *missense* do proto-oncogene RET, quanto de inversões, translocações ou alterações cromossômicas^{3,4}. Portanto, há diferentes vias de ativação do RET, que terão impacto direto no fenótipo da doença^{7,12}.

A proteína RET é constituída por 3 domínios:

1. Domínio extracelular, constituído por regiões similares às moléculas de adesão caderinas e regiões ricas em cisteínas, é codificado pelos primeiros 11 exons do gene^{3,4}. O domínio altamente conservado de cisteínas tem papel central na manutenção das estruturas secundária e terciária do domínio extracelular do RET, através da formação de ligações dissul-

feto intramoleculares. Mutações nestas cisteínas, transcritas dos codons 609, 611, 618, 620 do exon 10 e 634 do exon 11, prejudicam as ligações intramoleculares e passam a favorecer ligações bissulfeto intermoleculares, viabilizando a dimerização e fosforilação da proteína tirosino quinase RET, tornando-a ativa, mesmo na ausência de ligantes^{1,3,4,7}.

2. Domínio transmembrana

3. Domínio intracelular, com função na fosforilação de resíduos tirosina envolvidos na interação com moléculas alvos e na ativação de vias sinalizadoras celulares. Mutações nos codons 768 e 790 do exon 13 e 804 do exon 14 estão localizadas na ou próximas à região de ligação do ATP. Os aminoácidos 883 e 918 dos respectivos exons 15 e 16 contêm os sítios de ligação do substrato da tirosina quinase RET. As mutações nestes codons alteram diretamente o sítio de reconhecimento do substrato no interior do domínio tirosino quinase^{4,7}, aumentando sua afinidade com o ligante ou alterando sua especificidade, o que resulta numa variante precoce de CMT, freqüentemente fatal, quando acomete nódulos linfáticos e órgãos à distância^{2,3}.

Genótipo versus Fenótipo

A determinação dos diferentes fenótipos relatados para as mutações no proto-oncogene RET pode ser justificada pela indução diferenciada da dimerização do receptor. Portanto, as mutações codons específicas do RET têm relação direta sobre os diversos fenótipos da NEM 2 (Tabela 3), observando que a freqüência de cada mutação é estipulada pelo *background* genético da população em estudo e que a agressividade do tumor relaciona-se ao tipo de mutação apresentada.

•Exons 10 e 11

As mutações dos exons 10 e 11, encontradas em mais de 98% e 80% das famílias com NEM 2A e CMTF, respectivamente, provocam substituições dos resíduos de cisteína por vários outros aminoácidos⁴.

As mutações germinativas nos domínios de cisteínas do exon 10 - codons 609, 611, 618 e 620 - parecem impor uma ativação mais fraca do proto-oncogene RET, resultando em processo maligno tardio, tanto em NEM 2A quanto em CMTF^{1,4,9}. Alguns estudos indicam que as mutações 609, 618 e 620 oferecem menor risco de feocromocitoma e HPT, provavelmente pelo fato da paratireóide ser menos sensível à ativação do RET⁴.

A mutação germinativa no domínio de cisteína do exon 11 - codon 634 - produz uma ativação extremamente forte do proto-oncogene RET, direcionando para desenvolvimento mais precoce de CMT, além de predispor a feocromocitoma, HPT e CMTF^{4,7}, principalmente C634Y¹¹. Quando esta mutação ocorre em um indivíduo, o médico deve estar alerta para uma grande probabilidade de desenvolvimento de feocromocitoma e/ou HPT em membros da família². A maior freqüência de HPT se deve à mutação 634, principalmente C634R^{1,2}. Assim, pode-se dizer que esta mutação é responsável pela grande freqüência deste fenótipo - cerca de 87% dos pacientes^{4,7,9}. Em mais de 50% dos casos, a cisteína 634 é substituída por uma arginina (C634R)^{4,9}.

Conforme pode ser visualizado na tabela 3, a cisteína referente ao codon 634 pode ser substituída por outros 6 aminoácidos, que estão associados a diferentes fenótipos. Há indícios que o genótipo C634R responde pelo acometimento precoce de nódulos linfáticos e metástases à distância e, conseqüentemente, pela maior mortalidade, quando comparado aos genótipos C634Y e C634W na população brasileira, evidenciando que a substituição de um único nucleotídeo tem impacto direto na agressividade do tumor¹¹.

Segundo o *International RET Mutation Consortium*, a mutação no codon 634 tem papel preponderante na NEM 2A e também se relaciona ao desenvolvimento de CMTF, feocromocitoma e HPT, enquanto as mutações do exon 10 estão presentes na maioria das famílias com NEM 2A e CMTF^{2,9}. Em pacientes com CMTF, as mutações dos codons 609, 611, 618, 620 e 634 estão distribuídas igualmente, enquanto a mutação cisteína de codon 630 é menos freqüente^{2,4,9}.

•Exons 13 e 14

As mutações não cisteínas nos codons 768, 790 e 804 dos exons 13 e 14 também dispõem a ativações amenas, gerando principalmente CMTF^{4,7}, sendo rara a ocorrência de outros tipos de fenótipos, exceto para NEM 2A que tem se desenvolvido sob a mutação Leu790Phe. Estes dois exons têm mostrado, em alguns trabalhos, malignização tardia e menor agressividade, o que pode representar uma menor penetrância, assim como para o exon 15⁴. O CMTF torna-se um exemplo de ampla procedência genética por ser reflexo de mutações em seis exons, sabendo que 75% das mutações se distribuem em codons não-cisteínas⁵. Para o *International RET Mutation Consortium*, as mutações dos codons 768 e 804 tem a maior relevância fenotípica para as famílias com CMTF⁹. Recentemente, duas mutações no exon 14, V804M e Y806C foram descritas como associadas à ocorrência de formas mais brandas de NEM 2B⁸.

•Exons 15 e 16

No exon 15, a mutação S891A está associada, com baixa penetrância, ao desenvolvimento de CMTF^{4,5,7}, enquanto a mutação A883F foi demonstrada em um pequeno número de casos de NEM 2B^{4,8}. A mutação do codon 918 (M918T) no exon 16 está presente em mais de 95% dos casos de NEM 2B^{2,4,9}, sendo que as variantes M918T e A883F são exclusivamente associadas ao fenótipo NEM 2B^{4,8}. Não é rara a ocorrência da M98T em caráter *de novo*^{10,11}. No entanto, deve estar claro que a mutação M918T é a principal causa genética de NEM 2B e que foi a única mutação detectada em 64 famílias NEM 2B pelo *International RET Mutation Consortium*^{2,9}. A partir destes fatos, a identificação da mutação M918T é considerada diagnóstico de NEM 2B e, portanto, representa a vantagem de *screening* precoce, que possibilita a administração de medidas preventivas². Existe uma correlação entre o tipo de mutações do RET e as variantes fenotípicas da NEM 2 de uma família e, portanto, também com o planejamento das medidas preventivas. Diante disto, o CMT foi estratificado por grau de risco (1,2,3), segundo o trabalho de Brandt *et al.* (2001) e disposto na tabela 4¹.

Outros tumores da tireóide

•Carcinoma medular de tireóide esporádico

Cerca de 75% dos casos de CMT não apresentam relação familiar ou hereditária, sendo considerados esporádicos e diagnosticados entre os 50 a 70 anos^{4,12}. No entanto, mutações somáticas no proto-oncogene RET, principalmente M918T no exon 16 e S836S no exon 14, têm sido encontradas nos casos esporádicos^{2,4,12}.

•Doença de Hirschsprung

A doença de Hirschsprung (HSCR) é uma patologia não mendeliana de hereditariedade complexa, que está presente em 1:5000 recém nascidos^{4,5,13}, principalmente em indivíduos do sexo masculino¹³. Sua principal característica é a ausência de inervação no plexo mesentérico e submucoso do trato gastrointestinal. O proto-oncogene RET tem sido identificado como a principal causa genética da HSCR, no

qual as mutações germinativas do RET são encontradas em 40% dos casos de HSCR familiar e em 3 a 7% dos casos esporádicos⁴. Nenhuma das mutações tem penetrância completa, mas correlacionam-se à agangliose de diferentes extensões¹³. A simultaneidade de HSCR e NEM 2A ou CMTF tem ocorrido em resposta a uma mesma mutação, geralmente envolvendo cisteínas no exon 10. Algumas mutações determinam menores níveis de proteínas RET na superfície celular, o que afeta a formação do sistema nervoso entérico na HSCR e, ao mesmo tempo, as vias de ativação do RET nas glândulas tireóide e adrenal, o que pode predispor ao processo de carcinogênese⁴. As variações nos codons 609, 618 e 620 do exon 10^{1,2,4,5}, 691 do exon 11¹³ e a L769L do exon 13⁴ têm sido correlacionadas ao seu fenótipo. É recomendado que pacientes com HSCR com mutações no proto-oncogene RET sejam monitorados periodicamente devido ao possível desenvolvimento simultâneo de tumores NEM 2².

NEM 2: DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO

Testes bioquímicos

Habitualmente, o *screening* bioquímico é empregado para identificar manifestações clínicas da NEM 2 em indivíduos com um risco de desenvolvê-las. Calcitonina é o marcador mais empregado no *screening* bioquímico¹². A periodicidade da monitorização bioquímica é ditada pelo tipo de NEM 2 presente, pelo genótipo do RET e pelas manifestações clínicas da família¹.

O rastreamento de feocromocitoma baseia-se na monitorização da pressão arterial e dosagem de catecolaminas e metanefrinas em urina de 24 horas e plasma^{2,4,7}. Se estas dosagens estão elevadas, são recomendados os exames de imagem^{1,2}. O HPT é rastreado pelos níveis séricos de cálcio e hormônio paratireóide², podendo existir hipercalcúria e cálculos renais¹.

Um resultado aumentado para os ensaios de calcitonina basal e estimulada com pentagastrina ou cálcio injetável são preditivos de hiperplasia de células C ou CMT^{4,5,7}. Valores elevados de calcitonina após cirurgia é indicio de persistência ou recorrência da doença¹. O diagnóstico de feocromocitoma e CMT é geralmente confirmado por histologia².

Testes genéticos

Em 1993, o *background* genético do CMT hereditário foi conhecido e testes genéticos para a identificação de mutações germinativas no proto-oncogene RET passaram a constituir a base dos *screening* genéticos, os quais são informativos quanto à hereditariedade do tumor e também quanto ao risco de sua incidência. A recomendação da análise genética deve ser feita a todos indivíduos afetados e também a seus ascendentes e descendentes diretos, caso alguma mutação esteja presente^{4,7}. Isso permite a identificação de portadores de mutações no proto-oncogene RET, previamente ao início da sintomatologia e da morbidade relacionadas. Geralmente, o prognóstico de pacientes NEM 2 é melhor quando o diagnóstico é precoce e há intervenção terapêutica em tempo hábil⁴. A justificativa da indicação de testes genéticos e quando recorrer a eles se encontram resumidos no quadro 1 (A e B).

Um indivíduo não portador de mutações no proto-oncogene RET, mas pertencente a uma família com histórico de NEM 2, apresenta baixo risco de desenvolver a doença e deve passar por monitorização bioquímica esporádica. Contudo, se um indivíduo membro de uma família conhecida NEM 2 positiva é portador de alguma mutação no RET, este deve ser submetido a tireoidectomia total pro-

filática e a análise bioquímica para feocromocitoma e HPT, periodicamente, antes do aparecimento dos sintomas e da disseminação linfática, ou seja, a infância é a fase mais indicada para a realização deste procedimento^{2,4}. A periodicidade da monitorização bioquímica é ditada pelo tipo de mutação RET apresentada. Quando se trata de NEM 2B, uma forma mais precoce e agressiva, a remoção cirúrgica da tireoide deve ser efetuada ainda mais antecipadamente (por volta de 3 anos).

A recomendação de testes genéticos também se estende a CMT esporádicos, na tentativa de excluir ou incluir a hereditariedade do tumor em casos sugestivos, mas que envolvam famílias com poucos membros, tempo insuficiente para as manifestações do feocromocitoma ou do HPT, história familiar desconhecida e/ou ocorrência de mutações *de novo*. Portanto, em algumas situações, os resultados dos testes genéticos induzem à reclassificação do paciente quanto ao tipo de tumor apresentado, sendo comum o encontro de tumores hereditários entre tumores aparentemente esporádicos^{4,5,7}.

Não é recomendado o uso de tecido tumoral para a realização de testes genéticos. Cerca de 45% (de 23 a 70%) de CMT esporádicos e 10 a 15% dos feocromocitomas esporádicos apresentam mutações *missenses* somáticas (apenas no tecido neoplásico), principalmente no codon 918².

TABELA I
Classificação da NEM 2, conforme as principais manifestações clínicas presentes e suas freqüências (%) de ocorrência

NEM 2A	NEM 2B	CMTF
CMT (95%)	CMT (90%)	CMT (100%) isolado em no mínimo 4 membros da mesma família
Feocromocitoma (30-50%)	Feocromocitoma (50%)	
HPT (10-20%)	Ganglioneuromatose (100%)	
	Hábitos marfanóides (65%)	

TABELA II
Subclassificação da Neoplasia Endócrina Múltipla 2A

NEM 2A			
NEM 2A (1)	NEM 2A (2)	NEM 2A (3)	Outras
CMT	CMT	CMT	CLA ^a , ^b
Feocromocitoma	Feocromocitoma		HSCR ^{a,b}
HPT		HPT	

^a: Significa Lúmen Amilóide Cutâneo

^b: Significa Doença de Hirschsprung

Fonte: Mulligan et al, 1995; Puñales, 2004

TABELA III
Fenótipos NEM 2 de acordo com as mutações codon específicas nos exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do Proto-oncogene RET e suas respectivas alterações de aminoácidos.

Exon	Codon	Aminoácido	Fenótipo
10	609*	Cys para Arg	NEM 2A, CMTF
		Cys para Tyr	NEM 2A
	611*	Cys para Tyr	NEM 2A
		Cys para Trp	NEM 2A, CMTF
		Cys para Gly	CMTF
		Cys para Phe	NEM 2A
	618*	Cys para Ser	NEM 2A, CMTF
		Cys para Ser	NEM 2A, CMTF
		Cys para Gly	NEM 2A
		Cys para Arg	NEM 2A, CMTF
		Cys para Tyr	NEM 2A, CMTF
		Cys para Stop	NEM 2A
	620*	Cys para Arg	NEM 2A, CMTF
		Cys para Tyr	NEM 2A
		Cys para Phe	NEM 2A
		Cys para Ser	NEM 2A
11	630	Cys para Phe	CMTF
		Cys para Tyr	NEM 2A, CMTF
	634*	Cys para Arg	NEM 2A
		Cys para Phe	NEM 2A, CMTF
		Cys para Gly	NEM 2A
		Cys para Trp	NEM 2A
		Cys para Ser	NEM 2A
		Cys para Ser	NEM 2A, CMTF
13	768*	Glu para Asp	CMTF
	790	Leu para Phe	NEM 2A, CMTF
		Leu para Phe	NEM 2A, CMTF
	791	Tyr para Phe	CMTF
14	804*	Val para Leu	CMTF
		Val para Met	NEM 2B
	806	Tyr para Cys	NEM 2B
15	883	Ala para Phe	NEM 2B
	891	Ser para Ala	CMTF
16	918*	Met para Thr	NEM 2B

*O símbolo representa as mutações do proto-oncogene RET, reconhecidas pelo International RET Mutation Consortium, por estarem envolvidas na etiologia das Síndromes de Neoplasias Endócrinas Múltiplas.

TABELA IV
Classificação do risco de desenvolvimento de NEM 2 e seus componentes, de acordo com o genótipo RET dos pacientes portadores

Nível de risco de NEM 2	Codon com mutação	Fenótipo associado	Consequências
1 (Baixo)	609 768 790 791 804 891	NEM 2A e CMTF	* CMT de comportamento variável * CMT de crescimento lento * Idade mais tardia * Tireoidectomia total, mas não há consenso sobre a idade adequada
2 (Alto)	611 618 620 634	NEM 2A e CMTF	* Risco alto de CMT * Tireoidectomia antes dos 5 anos de idade
3 (Muito alto)	883 918 922	NEM 2B	* Maior agressividade do CMT * Tireoidectomia nos 6 primeiros meses de vida com dissecação nódulo central

Fonte: Brandi et al, 2001

Quadro 1A Testes genéticos: por quê fazê-los?	Quadro 1B Testes genéticos: quando são indicados?
- Identificação e intervenção precoces melhoram o prognóstico do CMT - Tratamento precoce com tireoidectomia profilática é bem tolerada - Maior taxa de resultados verdadeiros positivos - Menor taxa de falso positivos e negativos 98% de casos índices de NEM 2 tem uma ou mais mutações RET 1-7% dos tumores esporádicos apresentam mutações RET	- Todos casos de CMT esporádicos - Suspeita de CMT hereditário - Casos índices de NEM 2 e suas famílias - NEM 2B - Casos de feocromocitoma familiar e esporádico - HPT familiar - HSCR pediátrico

DISCUSSÃO

Apesar de ainda não existir um consenso quanto a melhor idade para a tireoidectomia profilática, a maioria dos estudos sugerem que esta seja realizada na infância, visando remover a glândula antes que a displasia das células C progrida para carcinoma medular e que ocorra disseminação linfática. Há diversos centros de estudo investigando a possibilidade de alguma relação entre mutações específicas e época mais adequada para a cirurgia, o que pode contribuir para a diminuição das dissecações de cadeia linfodol central e, conseqüentemente, para um menor índice de morbidade após cirurgia e maior taxa de cura. Trabalhos recentes indicam que os portadores de mutações RET submetidos a tireoidectomia total profilática, indicada pelo conjunto destes testes, apresentam menor estágio na classificação TNM e mudança das características do CMT para unifocal e unilateral⁵.

Baseando-se em resultados bioquímicos e genéticos, a efetuação de um diagnóstico prematuro viabiliza a intervenção cirúrgica em tempo hábil, o que pode prevenir a evolução de metástases do CMT e também aumentar a sobrevivência do paciente. Conseqüentemente, diferentes protocolos de acompanhamento para indivíduos portadores ou não das mutações são utilizados. Estas melhorias ampliam-se quando a análise laboratorial pode ser somada a uma detalhada história familiar. Por outro lado, muitas vezes, é a história familiar que desperta a iniciativa de se realizar os testes e que leva à conscientização da necessidade de medidas preventivas.

Os testes bioquímicos apresentam importância clínica na rastreabilidade fenotípica da doença, no acompanhamento pós-cirúrgico e na avaliação de indivíduos afetados ou não, mas não é rara a ocorrência de resultados falso positivos e falso negativos, além da interpretação de níveis de calcitonina elevada em crianças ser ainda um pouco obscura. Em

adição, estes testes não são capazes de determinar a predisposição hereditária à doença e nem o risco de seu desenvolvimento em pacientes assintomáticos. Um resultado negativo nos testes bioquímicos não exclui o risco de uma família afetada desenvolver a doença.

Vários estudos atualmente buscam entender o significado fenotípico de cada uma das mutações apresentadas ao longo deste texto. Algumas mutações codon específicas apresentam papel bem estabelecido no desenvolvimento da NEM 2, enquanto outras requerem estudos a longo tempo. Felizmente, o conhecimento molecular disponível atualmente permite oferecer ao paciente e sua família métodos seguros de identificação de mutações de significância clínica comprovada, que se faz por meio do seqüenciamento gênico. Até o momento, recomenda-se fazê-lo para os exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do proto-oncogene RET. Isto pode ser alterado, uma vez que mutações até então desconhecidas no RET podem ter um importante significado na clínica do paciente. O acompanhamento científico é primordial para a atualização da metodologia, a fim de evitar que resultados falso negativos ocorram.

É importante estar claro que tanto os testes genéticos quanto bioquímicos apresentam vantagens e desvantagens e que quando desenvolvidos isoladamente não permitem uma avaliação clínica eficaz do paciente e sua família. Na verdade, o papel de um é complementar o outro, de forma que juntos possam fornecer informações úteis e personalizadas na rastreabilidade, no estabelecimento do grau de risco, na prevenção, no diagnóstico e na monitorização das famílias com membros afetados pela neoplasia endócrina múltipla.

REFERÊNCIAS

1. Brandi M L, Gagel R F, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5658-5671, 2001.
2. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *JAMA*, 276: 1575-1579, 1996.
3. Falchetti A, Brandi M L. Genetic testing for multiple endocrines neoplasias.

Endocrine-Related Cancer; 5: 37-44, 1998.

4. Hansford J R, Mulligan L M. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet*, 37: 817-827, 2000.
5. Jindrichová S, Vcelak J, Vlcek P, et al. Screening of six exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *J Endocrinol*, 183: 257-265, 2004.
6. Klein I, Esik O, Homolya V, Szeri F, Váradi A. Molecular genetic diagnostic program of multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma syndromes in Hungary. *J Endocrinol*, 170: 661-666, 2001.
7. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm B O, Dralle H. Genotype-Phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1104-1109, 2001.
8. Menko F H, Van der Luijt R B, Valk I A J, et al. Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(1): 393-397, 2002.
9. Mulligan L M, Marsh D J, Robinson B G, et al. Genotype-Phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Internal Medicine*, 238: 343-346, 1995.
10. Pinales M K, Graf H, Gross J L, Maia A L. Rastreamento genético do carcinoma medular de tireóide: Identificação de mutações no proto-oncogene RET. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46(6): 632-639, 2002.
11. Pinales M K, Graf H, Gross J L, Maia A L. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2644-2649, 2003.
12. Pinales M K, Rocha A P, Gross J L, Maia A L. Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 48(1): 137-146, 2004.
13. Smigiel R, Lebiada A, Patkowski D, et al. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. *J Appl Genet*, 47(3): 261-267, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua Maranhão, 1040, Funcionários
CEP: 30140920. Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil
Tel: +31-32286769/Fax: +31-3228-6524
E-mail: alessandro@labhpardini.com.br