

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

A RBAC é classificada como Qualis Internacional A em farmácia.

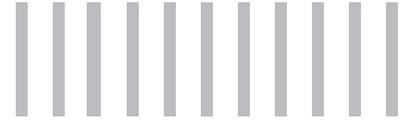
SUMÁRIO

Morfometria e quantificação de estruturas nucleares por meio de análise computadorizada de imagens para diagnóstico de malignidade.....	3
<i>Carla Filippin; Larissa Duarte Chirstofolletti; Túlio Vinicius Duarte Chirstofolletti; Cidônia de Lourdes Vituri</i>	
Morfometric and quantification of nuclear structures through computerized analysis of images for malignidad diagnosis	
Tempo de tratamento para atingir níveis de normalidade na anemia ferropriva.....	9
<i>Farias, I.L.G.; Colpo, E.; Pereira, W.V.; Luchesi, M.; Ambros, G.; Silva, J.E.P.</i>	
Time for the recovery of the normal levels in the iron deficiency anemia	
Frequência de bactérias gram-negativas em uroculturas de pacientes ambulatoriais, do Sistema Único de Saúde (SUS) de Maceió (AL), e sua sensibilidade a antibióticos.....	15
<i>Anderson Brandão Leite, Ana Rachel V. Lima, Herbert C. S. Barros, Renata B. Leite, Istela C. Araújo; Maria I.V.N. Tadeo & Ana Maria Q. López</i>	
Frequency of gram-negative bacteria in cultures of urine from ambulatory patients, of the unified health system (uhs) from Maceió (AL), and their sensitivity to antibiotics	
Prevalência do traço talassêmico beta em indivíduos com microcitose.....	21
<i>Raflo Cavalcanti de Medeiros, Raline dos Santos da Silva, Valéria Cristina Ribeiro Dantas, Tereza Maria Dantas de Medeiros</i>	
Prevalence of trait beta thalassemic in individuals with microcytosis	
Pesquisa de anticorpos anti-endomisio no laboratório de imunopatologia da ufpr: dez anos de experiência na triagem de doença celíaca em pacientes, grupos de risco e populações.....	27
<i>Shirley Ramos da Rosa Utiyama, Lorete Maria da Silva Kotze, Renato Mitsunori Nishihara, Isabela Goeldner da Silva, Flávia Raphaela Nass, Ricardo de Bem, Thelma Skare, Márcia L. Baptista, Iara Taborda de Messias-Reason</i>	
Antidendomyium antibodies evaluation in the laboratory of immunopathology of the ufpr: ten years of experience in the screening of celiac disease in patients, groups at risk and in the general population	
Ensaio clínico com as folhas de <i>Cissus sicyoides</i> L. (vitaceae) em pacientes intolerantes à glicose e em diabéticos tipo 2.....	35
<i>Hosana Bandeira Santos, João Modesto Filho, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Tereza Helena Cavalcanti de Vasconcelos, Francisco Santiago de Brito Pereira, Josué do Amaral Ramalho, Jadson Gomes Dantas, Esther Bandeira Santos</i>	
Clinical trials with the leaves of <i>Cissus sicyoides</i> L. (vitaceae) in glucose-intolerant and in type 2 diabetic patients	
Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim – SC.....	43
<i>Marcelo Luis Schmitt, Sérgio Luiz Ribeiro, Marco Antônio Siqueira Paes & Ricardo de Moraes Ribeiro</i>	
Gestational diabetes prevalence in São Joaquim – SC, Brazil	
Comparação entre a contagem manual e automatizada de células no líquido cefalorraquidiano.....	47
<i>Andrei Gustavo Bonavigo, Vanessa Gelinski, Gislaine Franco de Moura Costa, Jacqueline Plewka, Marco Antônio Costa</i>	
Comparison between the count manual and automatized of cells in cerebrospinal fluid	
Nocardiose disseminada em paciente leucêmico.....	51
<i>Rossana Sette de Melo Rêgo, Norma Suelly Sobral da Silveira, Kedma de Magalhães Lima & Francisco Montenegro Melo</i>	
Disseminated nocardiosis in leucemic patient	
Alterações hematológicas e morfológicas em fluidos biológicos de trabalhadores do distrito industrial de Erechim, RS.....	55
<i>Danielle Paula Simon, Lucila Ludmila Paula Gutierrez, Sandra Manoela Dias Macedo, Vanusa Manfredini</i>	
Hematologic and morphocytologic alterations in biologic fluids of workers of the industrial district of Erechim, RS	
Importância do controle de qualidade para a redução das amostras insatisfatórias cérvico-vaginais.....	61
<i>Etlinger DLR, Ducatti C, Gomes LP2, Pereira SMM, Teixeira MS, Silva VL, Yamamoto LSU</i>	
The importance of quality control to reduce unsatisfactory cervical smears	
Possíveis discrepâncias dos achados colposcópicos, citológicos, histológicos e moleculares- relato de um caso de pequena lesão cervical.....	65
<i>FILIPPIN, Carla; HAMADA, Fábio Massayuki.; CHISTOFOLETTI, Larissa Duarte; VIEIRA, Daniella Serafin Couto; VITURI, Cidônia de Lourdes</i>	
Possible discrepancies of findings colposcopic, cytology, histology and molecular - story of a case of small cervical injury	
Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie.....	69
<i>Lourdes Botelho Garcia, Joice Renata Bulla, Cinthia Regiane Kotaka, Maria Cristina Bronharo Tognim, Celso Luiz Cardoso</i>	
Bacteriological and salivary tests for evaluation of caries risk	
Lúpus eritematoso sistêmico (les): perfil clínico-laboratorial dos pacientes atendidos em um serviço privado de reumatologia na cidade de Santo Ângelo-RS.....	77
<i>Ricardo de Mattos Dutra & Tiago Bittencourt de Oliveira</i>	
Systemic lupus erythematosus (sle): clinical and laboratory profile of patients followed at a private rheumatology clinic in Santo Ângelo-RS	
Seleção de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, β-lactamase positiva portadoras do gene <i>mecA</i>.....	81
<i>Daiani Cristina Savi, Ana Paula de Col & Sideney Becker Onofre</i>	
Selection of <i>Staphylococcus aureus</i>, β-lactamase-positive strains with <i>mecA</i> gene	

1

VOLUME 41

2009



Prezados colegas,

É com alegria que venho convidá-los para mais um grande acontecimento, desta vez na cidade de Porto Alegre, no belo estado do Rio Grande do Sul. Trata-se do 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas (CBAC) que se realizará no período de 14 a 18 de junho de 2009. Estamos nos preparando para que este seja mais um grande sucesso de nossa sociedade.

Durante o congresso, contaremos com palestrantes internacionais e nacionais conceituados, além de empresas renomadas na área laboratorial, com o objetivo de oferecer aos participantes o que há de melhor no mercado. Para este evento, ampliamos nosso objetivo de capacitar e atualizar o profissional da área laboratorial; também, estamos conversando com os expositores para que ampliem suas ofertas de bons negócios. Acreditamos que assim realizaremos um evento que atenda às necessidades atuais de todos.

A programação está bem elaborada, com 95 eventos, dentre mesas-redondas, workshops, conferências, mini-cursos pré congresso e muito mais. Toda essa organização é para que você desfrute do que há de mais novo no mercado e possa se atualizar de uma forma melhor e mais completa, seja estudante ou profissional.

Por isso mesmo, estamos realizando em conjunto, o 4º Encontro Ibero Mercosul de Gestão de Qualidade em Estabelecimentos de Saúde. Dando assim ao 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas o perfil internacional que Porto Alegre merece, pela importância que tem no cenário nacional da área laboratorial.

Aproveite também para fazer passeios encantadores que a cidade oferece. Sem dúvida, esta é uma boa oportunidade para visitar a Serra Gaúcha e outras localidades com as maravilhas de uma colonização européia na arquitetura, gastronomia e vestuário.

E na grande festa do conhecimento, você é nosso grande convidado.

Este será, sem a menor dúvida, mais um grande congresso realizado pela SBAC para você.

Garanta já a sua inscrição, e nos veremos lá.

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: 4.800 exemplares

Bioquímica – Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Marcelo Quintão Mendes (MG), Dr. Geraldo Pichet (PR), Dra. Marileia Scartezini (PR), Dr. Arício Treitinger (SC), Dr. Paolo 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. Marinez Oliveira Sousa (MG), Dr. Nádilson da Silva Cunha (RJ), Dr. José Edson P. da Silva (RS), Dr. Rafael Noal Maresco (RS)

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), Dra. Raissa Mayer R. Cotão (PB)

Imunologia – Dr. Paulo Jaconi Saraiva (RS), Dr. Antônio Walter Ferreira (SP), Dra. Adelaide José Vaz (SP), Dra. Sílvia Fernandes R. da Silva (CE)

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), Dr. Robson Ferreira Ferraz Santos, Dr. José Edson Paz da Silva (RS)

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS®

FILIAÇÃO
IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE
COLABIOCLI - CONFEDERAÇÃO LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS
CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE
AMN - ASOCIACION MERCOSUR DE NORMALIZACION
ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO
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

D^{ra} 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: Dr. Celso Rubens L. Mendonça (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. Luís Fernando Barcelos (RS), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nádilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

DIRETOR DE CURSOS

Dr. Nádilson 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 - Asociacion Mercosur de Normalización:
Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luís 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 Maira 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. Nádilson 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. Nádilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Ney Haushahn (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Humberto Marques Tiburcio (MG)

REGIONAIS DA SOCIEDADE

Bahia: Presidente: Dr. Mário Martinelli Júnior - Vice-Presidente: Dr. Petrónio 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. Glaucio de Paulo B. Silveira; **Paraná:** Presidente: Dr. Paulo Roberto Hatschbach - Vice-Presidente: Dr. Oscar Pereira Alves - Secretário: Dr. Railson Henneberg - Tesoureiro: Dra. Mairim Isfer A. de Oliveira; **Pernambuco:** Presidente: Dr. Jurandir 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: Dr. Waldenilson Dutra Germano da Silva - Tesoureira Adjunta: Dra. Dóris Cavalcante Huguinin; **Rio Grande do Sul:** Presidente: Dr. Luiz Arno Lauer - Vice-Presidente: Dr. Antônio do Amaral Batista - Conselho Fiscal: Dr. Carmem Pilla e Vera Santa Fé - Suplentes: Dr. Alzira Resende do Carmo Aquino e Dr. Marcello Mascarenhas - Tesoureiro: Dr. Diogo André Pilger; **Santa Catarina:** Presidente: Dr. Caio Roberto Salvino - Vice-Presidente: Dra. Janeth Medeiros - Secretário: Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira - Tesoureiro: Dr. Célio Rogerio Ramos Filho

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:** Dr. Nery Bitner; **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; **São Paulo:** Dr. Marcos Machado Ferreira; **Sergipe:** Dra. Maria da Conceição L. Oliveira; **Tocantins:** Dr. Francisco Wellington Macedo.

Morfometria e quantificação de estruturas nucleares por meio de análise computadorizada de imagens para diagnóstico de malignidade

Morfometric and quantification of nuclear structures through computerized analysis of images for malignidad diagnosis

Carla Filippin¹; Larissa Duarte Chirstofoletti²; Túlio Vinícius Duarte Chirstofoletti³ & Cidônia de Lourdes Vituri⁴

RESUMO - Nos estudos de carcinomas cervicais uterinos pode-se utilizar além das técnicas citológicas convencionais para sua classificação, métodos histoquímicos na identificação da atividade celular. Um destes métodos é a técnica de AgNOR que consiste na coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) pelo nitrato de prata, a qual evidencia a atividade proliferativa das neoplasias mostrando uma tendência progressiva ou regressiva das lesões. O problema dos métodos citológicos é a subjetividade inerente das avaliações microscópicas. Com a evolução da informática foi possível captar imagens microscópicas, no entanto, para avaliações mais precisas, é necessário análise morfométrica de estruturas celulares. Objetivo: Desenvolver um programa para morfometria e quantificação dos pontos de NOR's em células escamosas da cérvix uterina coradas pela prata para diagnóstico de malignidade. Métodos e Resultados: Foram captadas 2500 imagens provenientes de amostras de raspado cervical de pacientes com suspeita de lesão e coradas pelo método de AgNOR. O programa foi idealizado a partir do sistema Scion Image e desenvolvido para determinar o número e área dos pontos NOR's, sendo nomeado como SACCi (Sistema de Análise Computadorizada Citológico). Conclusão: O SACCi identificou os NOR's, em imagens digitais, estabelecendo exatamente o número e a área ocupada em cada núcleo celular analisado, demonstrando claramente uma correlação positiva para o grau de agressividade das lesões cervicais. Finalmente, esta associação da informática com técnicas citológicas poderá se tornar uma ferramenta valiosa para os casos de difícil conclusão pelos métodos de classificação citológica convencionais.

PALAVRAS-CHAVE - AgNOR, citologia cérvico-vaginal, análise computadorizada de imagens.

SUMMARY - In the studies of uterine cervical carcinomas it can be used beyond the conventional cytological techniques for its classification, histoquímicos methods in the identification of the cellular activity. One of these methods is the technique of AgNOR that consists of the coloration of the regions organizers of nucléolo (NOR) for silver nitrate, that evidences the proliferative activity of the regressive neoplasias showing a gradual trend or of the injuries. The problem of the citológicos methods is the inherent subjectivity of the microscopical evaluations. With the evolution of computer science it was possible to catch microscopical images, however, for more necessary evaluations, it is necessary morfométrica analysis of cellular structures. Objective: To develop a program for morfometria and quantification of the points of NOR in escamosas cells of the uterine cérvix coradas by the silver for malignidade diagnosis. Methods and Results: 2500 Images proceeding from samples of scraped cervical of patients with suspicion of injury and coradas by the method of AgNOR had been caught. The program was developed from the system Scion Image and elaborated a program for determination of the number and area of the points of NOR's, being nominated as SACCi (System of Computerized Analysis Cytological). Conclusion: The SACCi identified the NORs, in digital images, accurately establishing the number and the busy area in each analyzed cellular nucleus, demonstrating clearly a positive correlation for the degree of aggressiveness of the cervical injuries. Finally, this association of computer science with cytological techniques, will be able to become a valuable tool for the cases of difficult conclusion for the conventional methods of cytological classification.

KEYWORDS - AgNOR, uterine cérvix cytology, computerized analysis of images.

INTRODUÇÃO

Uma grande aplicação da morfometria quantitativa é auxiliar na difícil discriminação entre células reativas benignas e células epiteliais malignas em vários tecidos. Muitos trabalhos da literatura relacionam medidas nucleares e citoplasmáticas como área, perímetro e diâmetro na diferenciação, principalmente, entre células reativas e carcinomas malignos (BIBBO, *et. al*, 2001.).

Segundo estimativas do Inca para 2006, o número de novos casos de câncer no Brasil chega a quase 500.000. Nos estados do sul do Brasil este índice é de mais de 100.000, sendo no estado de Santa Catarina quase 20.000 e na cidade de Florianópolis mais de 1.000 casos. (BRASIL, 2006).

Os cânceres resultam normalmente por mudanças na seqüência de DNA da célula, e provavelmente uma única cé-

lula anormal origina um tumor, e esta passa a anormalidade para a sua progênie, sendo um processo genético. Em geral o câncer não pode ser o resultado de um único evento ou uma única causa, mas resultam da ocorrência de vários acidentes independentes em uma célula com efeitos cumulativos.

O carcinoma escamoso invasivo do colo uterino ou cervical, é precedido por alterações pré-cancerosas no epitélio cervical da zona de transformação onde podem ser identificados histologicamente e que são usualmente descritas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC - Richart 1967). Estas alterações pré-malignas representam um aspecto contínuo de morfologia onde tem sido divididos em três estágios, NIC I, NIC II e NIC III (TAKAHASHI, 1982). As técnicas citológicas contribuem para o conhecimento dessas lesões e instalação de seu tratamento, reduzindo a incidência deste tipo de câncer (REIS, *et al.*, 1992; REZENDE FILHO, *et al.*, 1993).

Recebido em 27/05/2008
Aprovado em 26/01/2009

¹Aluna de Pós-graduação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina; ²Aluna do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina; ³Aluno de Pós-graduação em Ciências da Computação da Universidade Federal de Santa Catarina. ⁴Professora da Universidade Federal de Santa Catarina - ACL-CCS
Prêmio SBAC - 2008

Um indicador importante no comportamento biológico em vários tumores malignos é a proliferação celular e é considerada como um direcionador para a terapia do câncer (BROWN & GATTER, 1990).

Para avaliar com mais profundidade a atividade proliferativa das neoplasias, marcadores biológicos tem sido propostos para quantificar a proliferação celular. Nos estudos de carcinomas epidemóides cervicais pode-se utilizar métodos histoquímicos na identificação das células no ciclo celular.

Um dos marcadores biológicos de proliferação celular é o método histoquímico AgNOR, o qual traz novas perspectivas para a compreensão do crescimento tumoral, com conseqüentes repercussões para o prognóstico e a terapêutica dessas lesões (NEVILLE *et al.*, 1998), fornecendo a distinção entre células benignas e malignas, (SURESH, 1989; DERENZINI, *et al.*, 1990; SHIRO, *et al.*, 1993; THIELE & FISCHER, 1993; KASHYAP, *et al.*, 1998; KRUGER, *et al.*, 2000).

Muitos investigadores consideraram o tamanho e área como indicativos de malignidade e alguns deles também a forma e a localização dos pontos de AgNOR (PAPADIMITRIOU, 1991; TOSI, *et al.*, 1992; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001). No geral supõe-se que as células malignas mostram mais AgNORs por núcleo e têm pontos menores de AgNOR do que células benignas, (CROCKER, 1989) e a área total de AgNOR por célula aumenta junto com a malignidade (MARTIN, *et al.*, 1992; RUSCHOFF, *et al.*, 1992; RUSCHOFF, *et al.*, 1993; CHATTOPADHYAY, 1993; HABERLAND, *et al.*, 1996).

Com a melhoria da técnica AgNOR e o uso das medidas computadorizadas da área dos pontos NOR's dentro do núcleo, esta metodologia tornou-se mais reproduzível e de confiança (MARBAIX, *et al.*, 1989).

As medidas de área e contagem dos pontos NOR's são possíveis com o emprego de um programa que foi desenvolvido para analisar estas imagens, proporcionando a obtenção de parâmetros objetivos que quantificam o mensurando, ou seja, a atividade celular, permitindo definições reais e representativas da progressão da malignidade.

OBJETIVOS

Desenvolver um programa para morfometria e quantificação de estruturas nucleares para diagnóstico de malignidade. Diferenciar e classificar as células cervicais uterinas coradas pelo método histoquímico de AgNOR, utilizando parâmetros morfométricos como número e área das regiões NOR's, por meio de um método computadorizado de análise de imagens, com o intuito de sanar dúvidas diagnósticas encontradas nos métodos de classificação citológicas convencionais.

METODOLOGIA

Este estudo foi prospectivo em humanos com procedimentos experimentais "in vitro" com amostras de raspado celular de colo uterino.

Foram realizadas coletas de material cervical uterino de pacientes atendidas no Serviço de Residência Médica de Patologia Cervical da Maternidade Carmela Dutra. Durante o atendimento médico foi feita à coleta da amostra de material cervical com auxílio da espátula de Ayre. Foi confeccionado esfregaço em lâminas que foram imersas imediatamente em álcool 96°GL e encaminhadas ao laboratório onde foram submetidas à rotina de coloração por AgNOR.

TÉCNICA DE AGNOR

Preparou-se a solução aquosa de gelatina (solução coloidal)

com dissolução de 0,5g de gelatina e 25ml de água deionizada, em meio aquecido e depois de resfriada acrescentou-se 0,25ml de ácido fórmico (SIGMA) a 1% em água deionizada (solução reveladora). Solução de nitrato de prata foi preparada pela dissolução de 1g de cristais de nitrato de prata (MERCK) em 2ml água ultrapura, filtrada e acondicionada em frasco escuro, para evitar a oxidação do nitrato de prata. A preparação deve ocorrer no momento da coloração. As duas soluções foram utilizadas na proporção de 1:2 respectivamente no momento da coloração. Para o procedimento de coloração retiraram-se as lâminas com material cervical do frasco, e deixou-se secar ao ar. A seguir, foram adicionadas ao esfregaço gotas das soluções na proporção de 1:2 respectivamente, até cobrir o esfregaço. Em seguida, as lâminas foram colocadas em banho-maria a 62°C por 7 minutos, sobre suporte de maneira que não tocassem a água; até obtenção de coloração marrom-dourado na superfície do esfregaço. As lâminas foram enxaguadas em água destilada e seca ao ar. Depois de coradas, as lâminas permaneceram ao abrigo da luz até o momento da microscopia (HOWELL & BLACK, 1982)

As lâminas foram analisadas em objetiva de 100X. Para cada lâmina corada pela técnica de AgNOR foram analisadas 25 células escamosas representativas da área de lesão, células com alterações citológicas e seus núcleos selecionados e capturados digitalmente. Estes núcleos são vistos em coloração marrom e os NOR's no seu interior como pontos negros (HOWELL, & BLACK, 1980).

ANÁLISE DAS IMAGENS

Para as análises, os núcleos extraídos das imagens digitalizadas foram marcados, onde o sistema operacional Scion Image e o programa SACCi forneceram os seguintes dados morfométricos: tamanho e forma dos núcleos; contagem dos pontos de AgNOR por núcleo; e a percentagem da relação área de AgNOR/tamanho do núcleo.

No trabalho realizado foram digitalizadas as células selecionadas com um complexo de fotomicroscópio óptico Olympus BX41 com iluminação halógena, um adaptador para câmera de vídeo Olympus U-PMTVC com uma fotoculular PE 3,3 x 125 Olympus que produz um aumento visual de 330 vezes em combinação com a objetiva, e a conexão foi feita com uma câmera de vídeo digital color CCD Sony Exwave HAD, modelo SCC-DC54A de alta sensibilidade. Todas as imagens foram transmitidas a um computador Pentium III e a aquisição das imagens foi executada com o programa Software Image Pro Plus 4.0.

PROGRAMA DE IMAGEM – SACCi

O SACCi (Sistema de Análise Computadorizada Citológico) é um sistema que tem por objetivo identificar elementos em imagens digitais. Tal reconhecimento é feito baseado na detecção de bordas possíveis somente através de contraste de cores entre os elementos a serem reconhecidos.

O sistema foi concebido como uma ferramenta de auxílio para um analista, fazendo com que a decisão final fosse tomada pelo aumento ou diminuição da quantidade de elementos reconhecidos através da variação da intensidade dos filtros aplicados na imagem. Isto pode ser feito através de recursos dispostos pelas interações com o sistema.

Apesar de permitir o reconhecimento de elementos em imagens diversas o SACCi é um programa customizado para executar a comparação de tamanhos de elementos em uma imagem, mais especificamente o sistema foi construído com

o objetivo de auxiliar a análise de imagens de células com a coloração AgNOR. Portanto, foi estabelecido um fluxograma para que o mesmo execute as medições, comparações e possa gerar um relatório com os resultados.

COMPOSIÇÃO

O SACCi é um sistema que roda sobre a suíte de funcionalidades para tratamento de imagens Scion Image (Scion Corp). Esta suíte de funcionalidades fornece um ambiente, linguagem de programação proprietária, interpretador e API de funcionalidades para desenvolvimento de programas de processamento de imagens digitais.

A linguagem de programação proprietária é Pascal-like que permite o desenvolvimento de programas que são interpretados pelo Scion Image. Além de uma linguagem de programação a "Scion Image" fornece uma API para aquisição, edição e melhora de imagens e suporta imagens no formato TIFF e BMP.

Entre as funcionalidades da API para processamento de imagem do "Scion" estão: melhoria de contraste, fatiamento de densidade, escalas de cinza, smoothing, sharpening e detecção de bordas.

A suíte Scion Image é desenvolvida e distribuída pela Scion Corporation (SCHELLINI S. A.; et al). A suíte foi concebida para rodar sobre o sistema operacional Windows e para executar a suíte Scion Image (e conseqüentemente o SACCi) é necessário um PCI IBM PC com pelo menos 4MB de memória RAM livres ou 16MB de memória RAM livres para manipulação de imagens 3D. P

RECONHECIMENTO DOS ELEMENTOS

O reconhecimento dos elementos na imagem no SACCi é feito através de detecção de borda, porém esta detecção somente funciona se existir contraste de cores ou tonalidades entre os elementos a serem reconhecidos. Para realçar este contraste o SACCi aplica filtros na imagem quando vai fazer o reconhecimento dos núcleos e quando vai fazer o reconhecimento das regiões NOR's.

Os filtros de imagem aplicados não são os mesmos para os elementos, pois em uma imagem cada um dos elementos tem suas características e suas tonalidades, portanto o tratamento na imagem para reconhecê-los tem que ser de acordo com as suas características.

RECONHECIMENTO DOS NÚCLEOS

Em uma imagem na qual foi aplicada a coloração AgNOR os núcleos das células possuem tonalidades mais claras que as regiões NOR's, por esta razão para que o sistema detecte a sua borda e consiga medir todo o seu interior faz-se necessário que todo o núcleo possua uma tonalidade mais clara que as regiões NOR's mais escuras encontradas dentro dele. Para isso o SACCi aplica um filtro de Escala de Cinza (GrayScale) na imagem, e configura um threshold (valor mínimo) de cinza de modo que todo o núcleo fique na mesma tonalidade. Este valor mínimo foi configurado baseado em experimentação com um banco de imagens.

RECONHECIMENTO DAS REGIÕES NOR'S

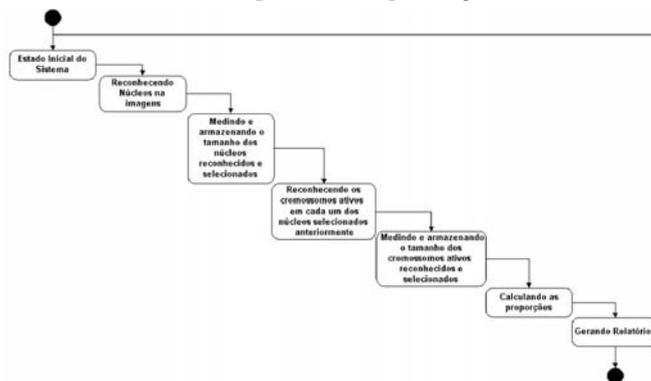
Em uma imagem na qual foi aplicada a coloração AgNOR as regiões NOR's dos núcleos possuem tonalidades mais escuras que os respectivos núcleos, para que o sistema detecte a sua borda e consiga medir todo o seu interior ignorando ou-

tros pontos corados no interior do núcleo que não sejam as regiões NOR's.

Para isso o SACCi aplica um filtro de Fatiamento de Densidades (Density Slice) na imagem, e configura o menor e o maior valor de tonalidade a ser reconhecido. Como os núcleos possuem tonalidades mais claras que as regiões NOR's e o filtro foi configurado para um valor acima da tonalidade dos núcleos, quando aplicado o filtro de Fatiamento de Densidade os núcleos desaparecem da imagem deixando apenas seu contorno e as regiões NOR's. Esta faixa de valores para reconhecimento apenas das regiões NOR's foi configurada baseada em experimentação com um banco de imagens.

FUNCIONAMENTO

A análise de uma imagem no SACCi segue a máquina de estados modelada e representada pela figura abaixo:



Estado Inicial do Sistema – Estado no qual o sistema aguarda instrução do analista, neste estado todas as configurações iniciais já estão carregadas.

Reconhecendo Núcleos na imagem – Neste estado o sistema já aplicou os filtros de reconhecimento de núcleos e o analista decide qual dos elementos reconhecidos na imagem são realmente núcleos, e os seleciona ou não.

Medindo e armazenando o tamanho dos núcleos reconhecidos selecionados – Neste estado o analista já decidiu qual são os núcleos na imagem e solicitou a medição de cada um deles. O sistema armazena quantos núcleos foram selecionados e o respectivo tamanho de cada um deles. Este tamanho é medido em pixels.

Reconhecendo as regiões NOR's em cada um dos núcleos selecionados anteriormente – Neste estado o sistema já aplicou os filtros de reconhecimento das regiões NOR's e o analista decide qual dos elementos reconhecidos na imagem são realmente regiões NOR's, e os seleciona ou não. Medindo e armazenando o tamanho das regiões NOR's reconhecidos e selecionados – Neste estado o analista já decidiu qual são as regiões NOR's em cada um dos núcleos na imagem e solicitou a medição de cada um deles. O sistema armazena quantas regiões NOR's foram selecionadas em cada um dos núcleos e mede o tamanho de todos e associa esta informação como seu respectivo núcleo. Este tamanho é medido em pixels.

Calculando as proporções – O sistema resgata a informação de cada um das regiões NOR's de cada núcleo, soma os tamanhos dos NOR's e executa o cálculo de proporcionalidade em relação ao seu respectivo núcleo e armazena este valor.

Calculando as proporções – O sistema imprime em um arquivo texto as seguintes informações:

- Quantidade de núcleos analisados

- Tamanho de cada um dos núcleos analisados
- Quantidade das regiões NOR's analisadas
- Soma dos tamanhos das regiões NOR's analisados por núcleos
- Relação proporcional do tamanho das regiões NOR's em relação ao núcleo

DETALHES DO FUNCIONAMENTO

O cálculo de proporcionalidade é diretamente afetado pela quantidade de núcleos/ regiões NOR's e seus respectivos tamanhos. Para evitar que algum elemento que se deseja medir seja esquecido de ser selecionado, o sistema possui um mecanismo de conferência de quantidades de elementos medidos com o que se deseja realmente medir.

Para tanto antes de selecionar os núcleos da imagem que serão medidos, o sistema pergunta ao analista quantos núcleos ele deseja medir, em seguida ele permite que o usuário meça quantos núcleos desejar.

Quando for efetuar os cálculos o sistema confere se a quantidade de núcleos selecionados é a mesma que se desejava, em caso de inconsistência o sistema avisa o analista que refaz as medições. O mesmo mecanismo é utilizado nas medições das regiões NOR's.

Para uma melhor usabilidade do sistema foram associadas, no teclado, atalhos para as funcionalidades do SACCi, assim é possível acessar as funcionalidades do sistema diretamente apertando determinadas teclas do teclado. Abaixo são apresentadas as teclas associadas a cada uma das funcionalidades do sistema:

- **G** - Configuração inicial do sistema quando carregado
- **C** - Executa a coloração das regiões NOR's identificados pelo SACCi
- **N** - Executa a coloração dos núcleos identificados pelo SACCi
- **M** - Executa a medição das áreas de interesses marcadas
- **S** - Executa o núcleo do SACCi (cálculo de percentual e relatório)
- **H** - Abre o HELP

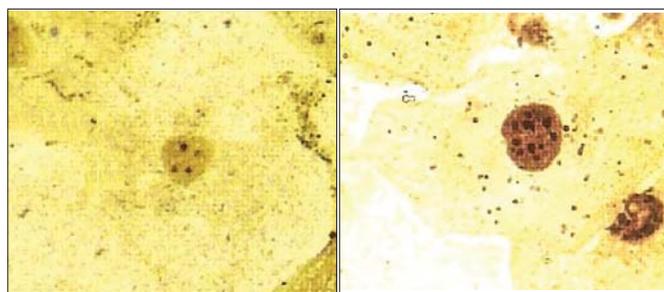


Figura 1: Imagens selecionadas na objetiva de 100X e captura-das digitalmente.

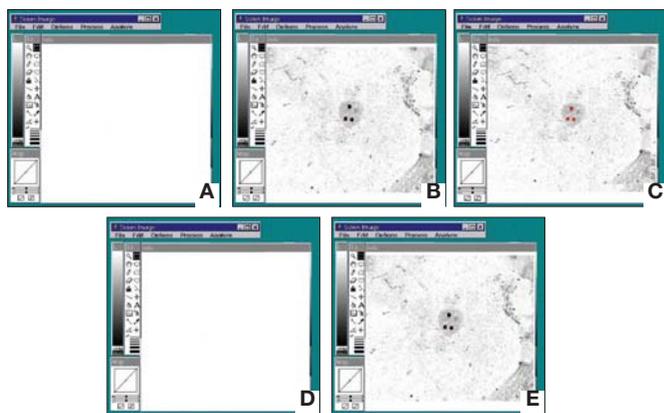


Figura 2: Seqüência de análise das imagens pelo programa SACCi. A- Programa SACCi, B- Imagem selecionada, C-NORs selecionados, D- Núcleo selecionado, E- Contagem dos pontos NORs

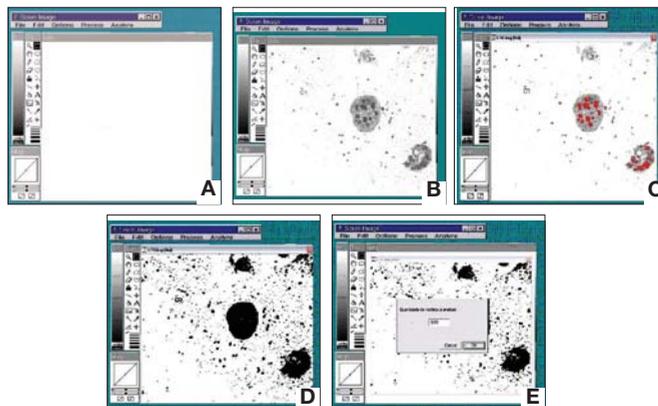


Figura 3: Seqüência de análise das imagens pelo programa SACCi. A- Programa SACCi, B- Imagem selecionada, C-NORs selecionados, D- Núcleo selecionado, E- Contagem dos pontos NORs

ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa INSTAT-2. A verificação dos níveis de significância foi por meio do teste não-paramétrico de Mann-Withney, onde foi considerado significativo quando $p < 0,05$. A análise da correlação foi verificada com o teste não-paramétrico de Spearman r , onde $r > 0,80$ foi considerado como bom índice de correlação.

RESULTADOS

A técnica de coloração de AgNOR permite que as células se apresentem com citoplasma de coloração amarelada, e os núcleos em castanho. Os NORs foram observados como estruturas intranucleares de cor marrom-café a negro. Os números de pontos NORs e sua área variaram com a gravidade da lesão; onde se observam pontos em quantidade de até quatro e menores que o nucléolo em células normais e, em células com alterações morfológicas de pré-malignidade e malignidade os pontos variaram em número e área no interior do núcleo.

Correlação entre número de AgNOR e resultados citológicos

Como resultados temos a média dos números de AgNORs em relação à classificação citológica. Observa-se uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico (Coeficiente de Spearman r : 0,8468).

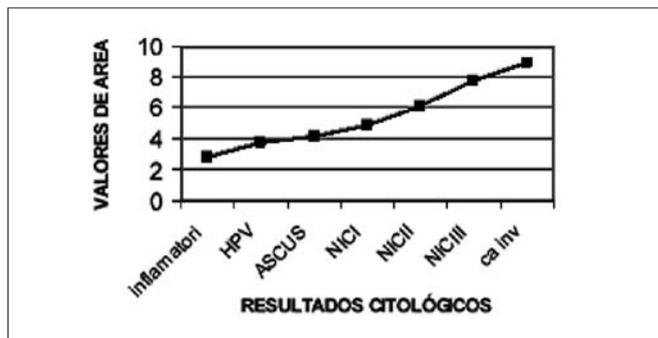


Figura 4: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richart, valor de $n = 85$. O resultado de análise estatística pelo Coeficiente de Spearman r : 0,8468.

Correlação entre área de AgNOR e resultados citológicos

Como resultados temos a média da área de AgNORs em relação à classificação citológica. Observa-se uma tendência crescente da média dos valores de área de AgNOR conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico (Coeficiente de Spearman r : 0,8468).

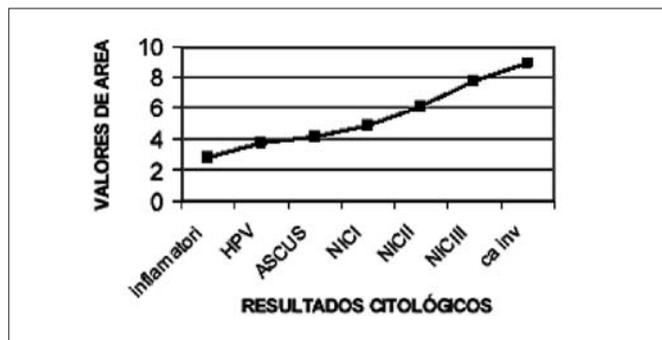


Figura 5: Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richart, valor de $n=82$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman r : 0,7596

O número de AgNOR e sua área relativa variaram consideravelmente nos diferentes níveis de alteração cervical: nos casos normais e/ou inflamatórios encontrou-se valores médios de número de 2,1 e área de 2,7; em HPV o número médio foi de 2,2 e área de 3,7; para ASCUS valores número médio foi de 2,8 e área de 4,1; enquanto que em NIC I (LSIL) o número médio foi de 3,7 e área de 4,9; em NIC II (HSIL) o número médio foi de 5,9 e área de 6,1; em NIC III (HSIL) o número médio foi de 6,3 e área de 7,8 e em carcinoma número médio foi de 9,4 e área de 8,9.

DISCUSSÃO

As imagens de alta qualidade é um instrumento muito importante na morfologia celular, com potencial a ser usado para definir casos de difícil diagnóstico pela citologia e histologia. A coloração AgNOR demonstra que o número e área de NOR's por célula pode ser uma marca de atividade celular incluindo malignidade, e seu estudo quantitativo é viável no campo oncológico, citológico e histológico, sendo que o número, tamanho e posição dos NORs podem fornecer dados morfológicos como critérios de malignidade (REEVES, *et al.*, 1982; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001).

O emprego do programa computadorizado de imagens facilita a execução das contagens dos pontos NOR's e possibilita a medida da área destes pontos NOR's em relação a área total do núcleo, permitindo a determinação concreta da atividade celular.

Na análise, um problema principal é causado pela aglomeração de depósitos pequenos a um ponto maior, que é difícil e às vezes impossível de estabelecer o número total de pontos pequenos. Para superar este problema a área de superfície total dos pontos de prata pode ser medida, com a vantagem de ser um método automatizado computadorizado, e a análise ser executada com maior confiabilidade (WIERZCHNIEWSKA, *et al.*, 1998). (PAPADIMITRIOU, 1991; TOSI, *et al.*, 1992; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa observou-se variação no número e área de AgNOR no núcleo, demonstrando alteração significativa destes parâmetros de acordo com a classificação citológica. Os dados apresentados nos resultados são correspondentes

com os da literatura que expressam valores de número de NOR's crescentes de acordo com a gravidade da lesão (EGAN, *et al.*, 1988; EGAN, *et al.*, 1990).

Outros dados também são relatados na literatura, onde segundo YOKOYAMA e colaboradores (1990) e SAKAI (2001), os pontos de AgNOR são significativamente mais elevados nos casos de lesão de alto grau quando comparados com pacientes normais e refere que nos casos de displasia que progrediram os pontos são significativamente mais elevados que os casos que regrediram. Os valores apresentados para o número e área dos NOR's, em todos os casos analisados, refletem uma tendência progressiva desse parâmetro, demonstrando ser esta Técnica um método válido e útil como auxílio diagnóstico, nas lesões de colo uterino.

Diante destes dados sugerimos que, se após minuciosa análise do material cervical uterino, através da técnica citológica, a conclusão diagnóstica for duvidosa, pode-se empregar a técnica de AgNOR como método auxiliar mais objetivo.

Neste trabalho a técnica foi aplicada em esfregaços citológicos cervicais, o que pode abrir possibilidades para seu emprego em laboratórios de rotina, pela facilidade na obtenção da amostra, rapidez e facilidade na coloração e na análise das imagens tornando-se um método diagnóstico confiável e objetivo.

Atualmente, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a acurácia do exame citopatológico, destacando-se entre elas a citologia em meio líquido ou citologia em camada delgada, que diminui a sobreposição celular, obtendo-se uma amostra mais uniforme, facilitando o emprego e melhoria de outras técnicas diagnósticas (EIFEL & LEVENBACK, 2005), como o emprego do programa de análise de imagens.

CONCLUSÃO

O sistema SACCi desenvolvido para a análise de imagens de células cervicais uterinas após coloração de AgNOR, demonstrou ser eficaz pela alta resolução e eficiência nas contagens das regiões NOR's bem como pela determinação da área relativa de NOR's ocupadas dentro do núcleo através da relação núcleo/NOR's área demarcadas. Com a metodologia histoquímica aliada ao emprego da morfometria computadorizada podemos sanar as dúvidas diagnósticas encontradas na classificação citológica das lesões cervicais, agilizando e facilitando o tratamento das pacientes. Esta metodologia histoquímica AgNOR, e o programa SACCi, com ligeiras modificações poderão ser empregadas para avaliar a proliferação celular também em outros tecidos.

REFERÊNCIAS

- BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derames Cavitários. 1 ed. Revinter. Rio de Janeiro. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, 2006.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody ki-67: it is use in histopathology. *Histopathology*. V. 17, n. 6, p.489-503. 1990.
- CHATTOPADHYAY, A. AgNORs in tumoral pathology. Review of literature and observations on the technic and reaction in normal oral epithelium. *Indian J Dent Res*. v. 4, n. 2, p. 47-53. 1993.
- CORTES-GUTIERREZ, E. I. et al. Polymorphism of Ag(+)-NORs in cervical smears from women with cervical cancer. *Anal Quant Cytol Histol*. v. 23, n. 1, p. 9-14. 2001.
- CROCKER, J., BODDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count Ag-NORs? Proposals for a standardized approach. *J. Clin. Pathol*. v.158, p.185-188,

- 1989.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÉ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest.* v.63, n. 1, p. 137-140. 1990.
- EIFEL, P.; LEVENBACK, C. Câncer do trato genital inferior feminino. *Revinter. Rio de Janeiro.* 2005.
- EGAN, M.J. et al. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* v.41, p.31-33, 1988.
- EGAN, M.; FREETH, M.; CROCKER, J. Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervical and the size and number of nucleolar organizer regions. *Gynecologic oncology.* v. 36, p. 30-33. 1990.
- HABERLAND, C, et al. AgNOR-analyse be astrocytomen des kindesalters. *Zentralbl. Neurochir.* v. 57, p.511, 1996.
- HOWELL, W. M; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* v. 36, 1980.
- HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosomal.* v. 62, p. 361-367. 1982.
- KASHYAP, S. et al. Nucleolar organizer regions and morphologic subtypes of squamous cell carcinoma of cervix. *Indian J Pathol Microbiol.* v. 41, n.3, p. 303-308. 1998.
- KRUGER, S.; STAHLHUT, M.; MULLER, H. cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 22, n. 5, p. 358-363. 2000.
- MARTIN, H. et al. Nucleolar organizer region-associated proteins in cancer cells. Quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 14, n.4, p.61-312-319. 1992.
- MARBAIX, E. et al. Nucleolar organizer regions in the normal and carcinoma epithelium of the uterine cervix. A morphometric study. *Int J. Gynecol Pathol.* v. 8, n. 3, p. 237-245. 1989.
- TAKAHASHI, M. Atlas color - Citologia del cancer. Panamericana. 2 ed. Buenos Aires. 1982.
- NEVILLE, D. W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C. M. Patologia epithelial in ____ Patologia oral & maxilofacial. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1998.
- PAPADIMITRIOU, C. S. et al. Nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic cancer endometrium. *Virchows Arch B Cell Pathol.* v.60, p.155-160. 1991.
- REEVES, B. R.; CASEY, G.; HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizer in different tissues, demons by silver staining of human normal and leukemic cells cancer gent. *Cytogenet.* v. 6, p.223-230. 1982.
- REIS, A. F. F. et al. Valor da citologia e da biópsia dirigida pela colposcopia no diagnóstico das neoplasias cervicais uterinas. *Jornal Brasileiro de Ginecologia.* v. 102, n. 5, p. 163-167. 1992.
- REZENDE FILHO, J. et al. Neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). Aspectos atuais da etiologia e do tratamento. *Jornal Brasileiro de Ginecologia.* v. 103, n. 5, p. 147- 151. 1993.
- RUSCHOFF, J. et al. Silver-stained nucleolar organizer proteins in urothelial bladder lesions. A morphometric study. *Pathol Res Pract.* v.188, n.4-5, p.593-598. 1992.
- RUSCHOFF, J. et al. Nucleolar organizer regions and glycoprotein-hormone al-phachain reaction as markers of malignancy in endocrine tumors of the pancreas. *Histopathology.* v.22, n.1, p.51-57. 1993.
- SURESH, U. R. et al. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. 1989.
- SHELLINI S. A.; R. C. PRETI; Yamamoto, R. K.; PADOVANI, C. R. Dimensões palpebrais antes e após blefaroplastia superior - Avaliação quantitativa . *Arq. Bras. Oftalmol.* vol.68 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2005
- SHIRO, T. et al. A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepato cellular carcinoma. *Cancer.* v.171, p. 44-49, 1993.
- THIELE, J.; FISCHER, R. Bone marrow tissue and proliferation markers: results and general problems. *Virchows Arch. A Pathol. Ant. Histopathol.* v.423, p.409-419, 1993.
- TOSI, P. et al. Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV). Quantitative data and cytokeratin expression. *Pathol Res Pract.* v. 188. n. 7, p. 866-873. 1992.
- WIERZCHNIEWSKA, A.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. Value of AgNOR counts and morphometric analysis of nucleolar parameters in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Pol J Pathol.* v. 49, n. 4, p. 297-301. 1998.
- YOKOYAMA, Y. et al. Nucleolar organizer regions in malignant transformations of uterine cervix. *Gynecologic oncology.* v. 39, p. 309-313. 1990.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Carla Filippin
Rua Pecho Ivo, 281
CEP. 88010-070 - Florianópolis - SC



**Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas**

Patrocinadora dos programas



**Programa
Nacional de
Controle de
Qualidade**



**Sistema
Nacional de
Acreditação**

41 anos

**Consolidando o Futuro das
Análises Clínicas no Brasil**

FAÇA A SUA PARTE. ASSOCIE-SE À SBAC.
Tel: 21 2187-0800 - www.sbac.org.br - geral@sbac.org.br

Tempo de tratamento para atingir níveis de normalidade na anemia ferropriva*

Time for the recovery of the normal levels in the iron deficiency anemia.

Farias, I.L.G*.; Colpo, E².; Pereira, W.V*.; Luchesi, M³.; Ambros, G³.; Silva, J.E.P⁴.

RESUMO - Para avaliar a efetividade e tempo para recuperação dos níveis normais de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), índices hematimétricos (HCM e VCM), foi realizado estudo retrospectivo de 576 hemogramas de 85 crianças de 1 a 6 anos, em tratamento para anemia ferropriva no Serviço de Hematologia/Oncologia do HUSM e entrevistas familiares. Os hemogramas foram realizados em aparelho STKS-Coulter e os dados analisados no programa Epiinfo. Das crianças, 21 apresentavam anemia discreta (AD), 40 anemia moderada (AM), e 24 anemia acentuada (AA). A eficácia foi avaliada considerando o incremento de Hb (IHb). Tiveram eficácia ruim 44,2% das crianças, com IHb de 0-1g/dL; eficácia boa 30,8%, com IHb de 1-2g/dL e muito boa 25%, com IHb superior a 2 g/dL de Hb. Houve relação significativa entre a Hb inicial e eficácia. No grupo AD o tempo de tratamento para atingir os níveis normais de Ht, Hb, VCM e HCM foram respectivamente 2,2 meses ($\pm 0,29$); 2,8 meses ($\pm 0,46$); 7,8 meses ($\pm 2,32$); 7,5 meses ($\pm 1,9$). No grupo AM: 6 meses ($\pm 1,1$); 8,4 meses ($\pm 1,37$); 12,5 meses ($\pm 1,98$); 12,7 meses ($\pm 2,14$). No grupo AA: 8,8 meses ($\pm 1,93$); 10 meses ($\pm 1,8$); 19,4 meses ($\pm 2,55$); 19 meses ($\pm 2,8$). Os tempos para atingir a normalidade variaram significativamente de acordo com o parâmetro utilizado e a severidade da anemia ($p < 0,005$).

PALAVRAS-CHAVE - anemia ferropriva, efetividade sulfato ferroso, índices hematimétricos

SUMMARY - To evaluate the effectiveness and time for the recovery of the normal levels of hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), RBC indices (MCH, MCV), was carried through retrospective study with analysis of 576 hemograms of 85 children of 1-6 years, in treatment for iron deficiency anemia in the Serviço de Hematologia/Oncologia of the HUSM and interviews with familiar ones. Of the children, 21 presented discrete anemia (AD), 40 moderate anemia (AM), and 24 accented anemia (AA). The effectiveness was evaluated considering the increment of Hb (IHb). They had bad effectiveness 44.2%, with IHb of 0-1g/dL; effectiveness good 30.8%, with IHb of 1-2g/dL and very good 25%, with IHb >2g/dL. In the AD group the time to reach the normal levels of Ht, Hb, MCV and MCH had been respectively 2.2 months (SEM 0.3); 2.8 months (SEM 0.5); 7.8 months (SEM 2.3); 7.5 months (SEM 1.9). In group AM: 6 months (SEM 1.1); 8.4 months (SEM 1.4); 12.5 months (SEM 1.9); 12.7 months (SEM 2.1). In group AA: 8.8 months (SEM 1.9); 10 months (SEM 1.8); 19.4 months (SEM 2.5); 19 months (SEM 2.8). The times to reach normality had varied according to different parameters used and the severity criteria of the anemia ($p < 0.005$).

KEYWORDS - iron deficiency anemia, effectiveness ferrous sulfate, RBC indices.

INTRODUÇÃO

A dificuldade de estabelecer valores críticos de hemoglobina (Hb) como ponto de corte de normalidade torna fundamental associar a Hb com outros indicadores bioquímicos, bem como relacionar com os índices hematimétricos.

Szarfarc *et al* (1), avaliando os níveis de ferro endógeno, demonstraram ser 11 g/dL de Hb valor aceitável de normalidade para crianças menores de 1 ano de vida. Utilizando o ponto de corte de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) de 24 pg, considerando Hb < 11 g/dL, obtiveram sensibilidade de 91%, especificidade de 42%, valor preditivo positivo de 71%, valor preditivo negativo de 75% e acurácia de 72% para crianças até um ano de vida. O limite de normalidade para o Volume Corpuscular Médio (VCM) é variável com a idade. Para crianças de 1½ a 4 anos o valor limite do VCM é 74 fL e para crianças de 4 a 7 anos é 76 fL(3).

A suplementação oral com sais de ferro para crianças é preconizada na dose de 1-2 mg/Kg/dia de ferro elementar para profilaxia; 3mg/kg/dia para anemia discreta e 4-6 mg/kg/dia para crianças apresentando anemia grave (4,5). Resposta positiva ao tratamento pode ser definida

como um aumento diário na concentração de hemoglobina da ordem de 0,1 g/dL a partir do quarto dia. A terapia deve continuar por mais dois ou três meses para recuperar os estoques de ferro do organismo (6).

A absorção do ferro não heme, inclusive o ferro dos medicamentos, é determinada por fatores estimuladores que mantêm o mineral sob a forma reduzida, portanto solúvel, e por inibidores que se ligam ao ferro, tornando-o insolúvel e impedindo sua absorção. Desta forma, para uma boa resposta terapêutica são necessários cuidados com o horário das medicações e o uso concomitante de alimentos facilitadores da absorção do ferro. Outro fator importante refere-se à adesão ao tratamento, que no caso da suplementação com sulfato ferroso sofre forte influência pela presença de efeitos colaterais como diarreia, vômito associada ao gosto metálico da medicação (8).

A não resposta ao tratamento pode ser indicativa de outras anemias microcíticas/hipocrômicas sendo necessários exames complementares tais como eletroforese de hemoglobina, pesquisa de Hb "H" e hemoglobinas instáveis. Portanto, conhecer as variações dos tempos de tratamento com fármacos contendo ferro para que as variáveis bioquímicas atinjam o ponto de corte para a normalidade, auxilia não só a avaliar a eficácia do tratamento, como

Recebido em 19/10/2007
Aprovado em 26/01/2009

*Serviço de Hematologia/Oncologia – Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal Santa Maria.
Av. Roraima s/n. Campus da UFSM. 97.105-900 Santa Maria-RS.

²Deptº Bioquímica, CCNE, Universidade Federal Santa Maria.

³Laboratório de Análises Clínicas, HUSM, Universidade Federal Santa Maria

⁴Deptº Análises Clínicas e Toxicológicas, CCS, Universidade Federal Santa Maria.

confirma a hipótese diagnóstica de anemia ferropriva e fornece dados para determinar o término do tratamento.

METODOLOGIA

O Presente estudo foi conduzido em duas fases. Na primeira, foi realizada a revisão dos prontuários das crianças em tratamento para anemia ferropriva no Serviço de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria, com objetivo de avaliar a recuperação dos níveis de Hb; hematócrito (Ht); HCM, VCM. Foram analisados 576 hemogramas de 85 crianças, que vinham regularmente ao HUSM, para consultas e exames de controle.

Na fase dois, foi realizada entrevista com familiares destas crianças, que consultaram no HUSM no período de julho a novembro de 2005, com objetivo de identificar as variáveis que estariam influenciando a eficácia do tratamento. Todas as mães ou acompanhantes das crianças que tiveram consulta neste período foram convidadas a participar do estudo. As que concordaram com o estudo receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Apenas uma (01) mãe se recusou a participar do estudo. Era considerado apto à entrevista o acompanhante que permanecesse no mínimo 8hs com a criança. Por esse critério um (01) pai foi excluído, por não morar junto com a criança. Do total de 85 crianças em tratamento no Serviço de Hematologia/oncologia cujos hemogramas haviam sido avaliados na fase 1, foi possível realizar 58 entrevistas, no período pré-determinado da fase 2.

O questionário continha questões sobre assistência farmacêutica e uso correto do medicamento; adesão ao tratamento e efeitos colaterais; noções de saúde; aspectos sócio-econômicos e nutrição. Os efeitos colaterais foram coletados apenas nas entrevistas, com a percepção da mãe (ou responsável da criança) da relação desses com o uso do medicamento, o que poderia interferir na adesão e conseqüente efetividade do tratamento.

Os hemogramas foram realizados em aparelho STKS-Coulter e foi estabelecido como ponto de corte para anemia Hb<11 g/dL; VCM<75 fL; HCM<25 pg.

Os dados analisados com o programa Epiinfo, versão 3.3.2, de fevereiro de 2005, do CDC/USA. Também foi realizada análise de variância cujo modelo incluiu a variável renda, escolaridade da mãe, idade da mãe, profissão, frequência à creche, medicação, dose, aquisição da medicação, uso de facilitadores da absorção, presença de inibidores da absorção, efeitos colaterais, recusa em tomar a medicação, suspensão temporária do tratamento e idade da criança correlacionando com eficácia e a interação entre essas variáveis (valor de correlação).

Para fins de análise estatística optamos por fazer a classificação do grau de anemia (anemia acentuada, moderada ou discreta) utilizando a distribuição de frequência, de forma que o intervalo de cada classe tivesse a mesma amplitude. Utilizamos a fórmula: $h=H/K$, onde h é o intervalo de classes, H é a diferença entre o maior e o menor valor observado e K o número de classes. Desta forma os pacientes foram agrupados em 03 classes, conforme a Hb: anemia acentuada (AA), com Hb entre 4,1g/dL e 6,7g/dL; anemia moderada (AM) com Hb entre 6,8 e 9,4g/dL e anemia discreta (AD) com Hb superior a 9,5 g/dL.

A eficácia foi avaliada considerando o incremento de hemoglobina nos 30 primeiros dias de tratamento. Foi considerada eficácia ruim (e.RUIM) incremento de 0-1g/dL de hemoglobina; boa (e.BOA) de 1-2g/dL de hemoglobina e

muito boa (e.MB) superior a 2 mg/dL de hemoglobina. O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética da UFSM (CAAE 0052.0.246.000-05).

RESULTADOS

A idade média das crianças em tratamento era de 34,1 meses (σ 15,5 meses), com valores mínimos de 10 meses e máximo de 63 meses. O tempo médio de tratamento foi de 14,2 meses (σ 11,8), com valores mínimos de 01 mês e máximo de 45 meses.

A Hb média no início do tratamento era 8,7g/dL, (σ 2,03), com valor mínimo de 4,6 e máximo de 11,8g/dL; Ht 27,9 % (σ ; 5,18); os índices hematimétricos médios eram VCM 60,6 fL (σ 10,24); HCM 19,23 pg (σ 4,47); RDW 18,83%. (σ 4,65).

Das 85 crianças do estudo, 21 estavam no grupo AA; 40 no grupo AM e 24 no grupo AD. Os valores de Hb, HCM, VCM, ferro sérico, Capacidade Total de Ligação do ferro (CTLF), ST e ferritina estão na tabela 1.

Tiveram e.MB 25% das crianças; e.BOA 30,8% e e.RUIM 44,2% das crianças em tratamento. Correlacionando a Hb inicial com a eficácia temos uma melhor resposta no grupo de crianças com anemia acentuada ($\chi^2=10,7$; Gl=4; $p=0,03$) onde 55,6% tiveram e.MB; no grupo anemia moderada e discreta 26,9% e 5,9% das crianças teve e.MB, respectivamente. O percentual das crianças com e. RUIM não variou muito nos três grupos, conforme fig.1. Nesta amostra, a idade não teve relação significativa com a eficácia do tratamento ($p>0,05$).

A hemoglobina média após 30 dias de tratamento passou a 9,9 g/dL (σ 1,59); VCM 64,4 fL (σ 8,09); HCM 20,64 pg (σ 2,93).

O tempo médio de tratamento para recuperação do hematócrito no grupo AA (média \pm erro padrão) foi de 8,83 meses (\pm 1,93), no grupo AM 6,0 meses (\pm 1,1) e no grupo AD 2,25 meses (\pm 0,29) e $p=0,0002$ (Kruskal-Wallis H).

A recuperação da normalidade para Hb ocorreu no grupo AA em 10,06 meses (\pm 1,8), no grupo AM em 8,43 meses (\pm 1,37) e no grupo AD em 2,85 meses (\pm 0,46) e $p=0,0001$ (Kruskal-Wallis H).

O tempo médio de tratamento para recuperação do VCM para o grupo AA foi de 19,38meses (\pm 2,55), no grupo AM foi de 12,47 meses (\pm 1,98) e no grupo AD 7,8 meses (\pm 2,32) $p\leq 0,0062$ (ANOVA, Kruskal-Wallis H).

Para HCM, o tempo de tratamento para atingir o ponto de corte no grupo AA foi de 19,08 meses (\pm 2,8), AM 12,72 (\pm 2,14) e no grupo AD 7,5 meses (\pm 1,9) e $p\leq 0,0041$ (ANOVA, Kruskal-Wallis H), conforme fig. 2.

A eficácia e os fatores que poderiam interferir na efetividade da terapêutica foram coletados da entrevista de 58 familiares das crianças em tratamento.

Os dados dessa amostra são descritos a seguir. Com relação ao tempo de tratamento no momento da entrevista, 20 crianças (35,08%) estavam em tratamento há menos de 6 meses; 14 (24,56%) entre 7 e 12 meses; 15 (26,31%) entre 13 e 24 meses; 5 (8,77%) entre 25 e 36 meses e 3 (5,26%) entre 37 e 45 meses. Apenas 1 criança tinha idade inferior a 12 meses; 16 (28,07%) tinham entre 12 e 24 meses; 20 (35,08%) entre 25 e 36 meses; 9(15,79%) entre 37 e 48 meses; 8 (14,06%) entre 49 e 60 meses e 3 (5,26%) maiores de 61 meses de idade.

A renda per capita das famílias era inferior a R\$100,00 para 46,3%; 27,8% ficavam entre R\$ 101,00 e 150,00 e 25,9% eram superior a R\$150,00. Os fatores sócios econômicos não tiveram variação nos grupos.

Com relação ao medicamento, 65,5% estavam em uso de Sulfato ferroso, 7,3% de ferro bis-glicina quelato e 23,6% iniciaram o tratamento com sulfato ferroso e substituíram por ferro bis-glicina quelato. Não houve variação significativa na efetividade dos diferentes fármacos ($\chi^2 3,1$; Gl 4; $p=0,54$) nem com as doses prescritas ($\chi^2 1,46$; GL 4; $p=0,83$). Das crianças em uso de sulfato ferroso, 28% tiveram diarreia, 28% tiveram vômito, 6% tiveram vômito e diarreia e 36% não apresentaram efeitos colaterais. As crianças em uso de ferro bis-glicina quelato não apresentaram efeitos colaterais. Os efeitos colaterais com relação à dose de sulfato ferroso mostram um aumento do vômito com o aumento da dose. Das crianças recebendo sulfato ferroso na dose de 3mg/kg/dia, 9,1% tiveram vômito; das recebendo 4mg/kg/dia, 27,3% tiveram vômito e das crianças recebendo 5 mg/kg/dia, 63,6% tiveram vômito. Observou-se que 67,3% das crianças em uso de sulfato ferroso se recusavam a tomar a medicação.

Em relação ao local onde foram adquiridos os medicamentos, 70,4% foram comprados em farmácias comunitárias (farmácia comercial) e 29,6% retirados nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) ou Programa Saúde da Família (PSF), apesar da prescrição ter sido feita em hospital universitário. Com relação à aquisição do medicamento, 52,7% das famílias não tiveram dificuldades em adquirir o medicamento, 32,7% tiveram dificuldades financeiras para aquisição e 14,5% faltou medicação na UBS ou PSF. Apesar das dificuldades a maioria das famílias (83,6%) conseguiu adquirir os medicamentos, buscando recursos com outros membros da família ou remanejando orçamento.

Pelo somatório de fatores (recusa em tomar a medicação e/ou efeitos colaterais e/ou dificuldade financeira), 30,9% das mães suspenderam por algum momento o uso do medicamento.

Quanto ao uso de alimentos facilitadores da absorção do ferro, 29,6% utilizavam corretamente suco de frutas cítricas, predominantemente laranjas, junto com a medicação, 11,1% utilizavam eventualmente ou não concomitante e 59,3% não utilizavam. Quanto à presença de inibidores da absorção do ferro, 60,4% das mães não administravam a medicação junto com alimentos inibidores, respeitando os horários recomendados pelo médico (1 hora antes das refeições).

Ao todo, 14 variáveis foram avaliadas, correlacionando com a eficácia. Nenhuma das variáveis teve correlação significativa com a eficácia ($p > 0,05$).

Tabela I

Valores de Hb, índices hematimétricos e outros marcadores bioquímicos de crianças com anemia ferropriva, menores de 6 anos de idade, distribuídos de acordo com a severidade da anemia em 3 grupos: AA(anemia severa), AM(anemia moderada), AD(anemia discreta).

Grupo	n	Hb g/dL	HCM pg	VCM fL	RDW %	Ferro sérico µg/dL	ST %	Ferritina ng/dL
AA	21	5,63 (±0,18)	13,71 (±0,26)	48,18 (±0,56)	23,50 (±0,76)	13,05 (±1,00)	3,02 (±0,25)	4,24 (±1,24)
AM	40	8,18 (±0,14)	17,86 (±0,44)	57,70 (±1,06)	19,41 (±0,54)	21,84 (±2,55)	5,77 (±0,32)	4,61 (±0,57)
AD	24	10,38 (±0,16)	21,90 (±0,49)	67,83 (±1,16)	19,74 (±1,27)	34,75 (±2,27)	16,89 (±0,63)	14,11 (±1,73)

AA= anemia acentuada; AM=anemia moderada; AD= anemia discreta; Hb=hemoglobina; HCM= hemoglobina corpuscular média; VCM= volume corpuscular médio; RDW= índice de anisocitose; ST= saturação da transferrina. Valores expressos em média ± erro padrão

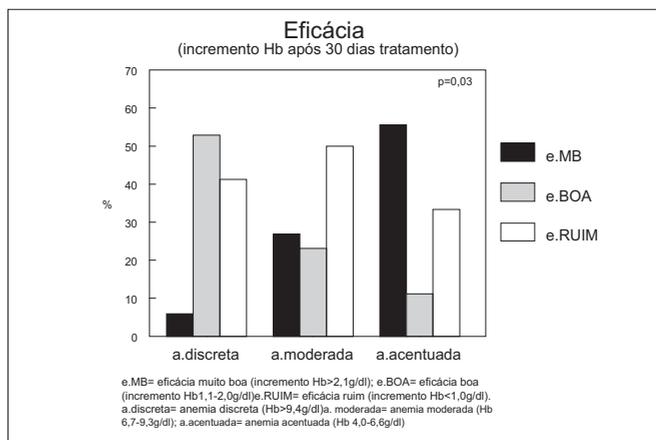


Figura 1: Avaliação da eficácia da suplementação com ferro oral com crianças menores de seis anos de idade, usando como medida o incremento de hemoglobina após 30 dias de tratamento.

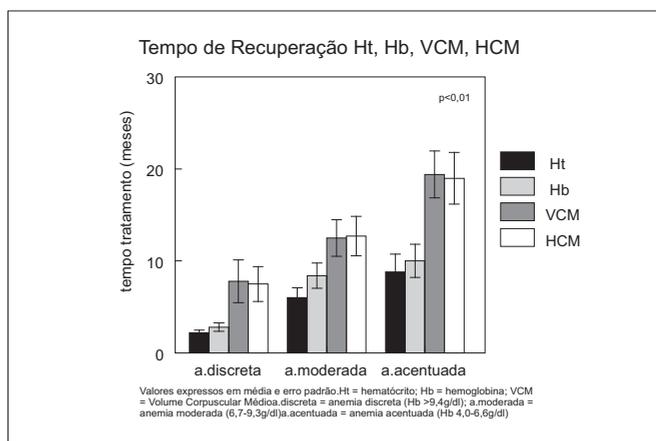


Figura 2: Tempo de tratamento para recuperação dos valores de normalidade para Ht, Hb, VCM e HCM de crianças menores de 6 anos de idade, recebendo ferro oral.

DISCUSSÃO

A renda per capita das famílias integrantes do estudo confirma dados de diversos autores, demonstrando uma relação de renda com prevalência de anemia. Silva *et al* (7) encontraram razão de prevalência de anemia de 1,6 para famílias com renda per capita igual ou inferior a um (01) salário mínimo. Nesta faixa estava contida a totalidade das famílias de nosso estudo.

A menor prevalência de anemia em crianças menores de 02 anos de idade em nosso estudo deve-se possivelmente à dinâmica de atendimento do SUS, onde inicialmente essas crianças foram atendidas em Unidades Básicas de Saúde e/ou Unidades Saúde da Família e posteriormente encaminhadas ao Serviço de Hematologia/Oncologia do HUSM.

Com relação à assistência farmacêutica, observaram-se falhas na aquisição do medicamento, no uso correto (horários, administração junto com alimentos inibidores e facilitadores da absorção do ferro) e na adesão ao tratamento, porém nenhum dos itens isoladamente foi estatisticamente significante quando relacionado com a eficácia do tratamento ($p > 0,05$). Torres *et al* (8) em estudo com crianças de 4 a 36 meses de idade em São Paulo, verificaram que quando a mãe administrava corretamente o fármaco, a anemia caía de 48,4% para 28,1% ao final da inter-

venção. Se a administração se dava de forma incorreta essa queda era de 58,6% para 43,1%. Neste mesmo estudo foi encontrada uma prevalência de 12,4% de diarreia, usando uma dose profilática de 12mg/dia de ferro, diferindo de nossos dados, onde foram observados 28% de diarreia, possivelmente devido à diferença de dose.

O aumento da incidência de vômito com o aumento da dose de ferro prescrita pode estar relacionado com o gosto do medicamento, que com volume maior torna-se difícil de ser mascarado.

Na avaliação da resposta terapêutica, observou-se melhor resposta no grupo com menor hemoglobina inicial (AA). Pacientes com anemia severa podem ter um acréscimo mensal de 2g/dl, recuperando os níveis de hemoglobina em 1 a 2 meses (5). Em nosso estudo apenas 25% dos pacientes tiveram essa resposta ideal. O incremento médio de hemoglobina após 30 dias de tratamento foi de 1,2g/dL, resultado semelhante a outro estudo usando 5mg/Kg/dia de sulfato ferroso que obteve um acréscimo de Hb de 1,3g/dL (9) e superior aos ensaios utilizando dose profilática, com IHb de 0,68g/dL (8). Esses dados demonstram a dificuldade em atingir uma efetividade ideal dos tratamentos com ferro oral em crianças menores de seis anos de idade.

O tempo de tratamento para recuperação do Ht, Hb, VCM e HCM variou significativamente entre os grupos AA, AM e AD. Observou-se uma boa correlação Ht/Hb e VCM/HCM, que estão de acordo com os dados de Hadler *et al* (10) que encontraram para correlação Ht e Hb $r=0,946$ e entre HCM e VCM $r=0,950$.

O Ht foi a primeira variável bioquímica a atingir a normalidade, seguida da Hb. Verificou-se grande diferença no tempo para recuperação da normalidade comparando os binômios Ht/Hb e VCM/HCM. Assim, no grupo AA a diferença entre a recuperação da Hb e do HCM foi de 9 meses e de 4,6 meses no grupo AD. O tempo para atingir a normalidade da Hb foi de 10 meses para AA e 8,4 para AM, havendo sempre um crescente nos valores até esse período. Ferreira *et al* (11) avaliando a duração do tratamento, encontraram aumento dos níveis de Hb, como indicador de dose resposta, até o período de 18 a 23 semanas. A partir desse momento houve estabilização dos níveis de Hb, indicando ser esse o momento de exaustão de resposta e, portanto, o momento de interromper a administração de sulfato ferroso. Neste período, em nosso estudo, houve apenas recuperação de Ht e Hb dos grupos AM e AD, permanecendo a hipocromia e microcitose em todos os grupos, uma vez que o VCM e HCM tiveram recuperação tardia.

Aslan & Altay (12), encontraram resultados que diferem dos anteriores, quando avaliaram o eritrograma de crianças suplementadas com ferro por 12 semanas, que haviam sido divididas em dois grupos, de acordo com o número de eritrócitos (alto RBC $>5 \times 10^6/\mu\text{l}$ e baixo RBC $\leq 5 \times 10^6/\mu\text{l}$), sendo que no grupo "baixo RBC" havia maior percentual de crianças com anemia severa. Neste estudo encontraram diferença significativa, entre os dois grupos, na elevação do Ht até 2 semanas de tratamento e do VCM até 4 semanas de tratamento. O VCM e HCM aumentaram gradualmente até 12 semanas de tratamento, ao final da quais todos os índices atingiram o ponto de corte para normalidade. Embora com tempos diferente, tanto em nosso estudo como no dos autores citados, ocorreu primeiro a recuperação do Ht. Wright *et al* (13) demonstraram que crianças com Hb e HCM abaixo do ponto de corte tiveram a melhor resposta terapêutica

($p < 0,001$) do que as crianças com Hb e HCM normal e apenas outro marcador anormal (VCM, ferritina, Zinco protoporfirina) as quais demonstraram pequena resposta terapêutica. Este estudo demonstrou a superioridade do HCM como preditivo de uma resposta terapêutica favorável com suplementação de ferro e também maior robustez em relação ao VCM.

Cook *et al* (14) evidenciaram que a determinação da quantidade de ferro corporal, utilizando razão receptor de transferrina sérica e ferritina sérica, é necessária para melhor avaliar o impacto da suplementação com ferro, pois a determinação da Hb ou Ht é imprópria para determinação do status de ferro. Neste estudo, reavaliando triagem clínica com intervenção com sulfato ferroso, onde não havia diferença significativa na Hb entre os grupos, utilizando a estimativa de ferro corporal, essa diferença era facilmente identificada.

A determinação do conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos indica que a menor hemoglobinização dos reticulócitos na anemia ferropriva são condizentes com uma maior atividade eritropoiética compensatória, limitada, porém, pela menor disponibilidade de ferro para a síntese de hemoglobina (15). Assim, em estudo com mulheres com anemia ferropriva, recebendo ferro por duas semanas, Brugnara (16) observou um rápido aumento no conteúdo de Hb do reticulócito (CHr), que passou de 18,1pg para 23,4pg ($p < 0,001$) porém um aumento mínimo do HCM (de 19,7pg para 20,3pg) e VCM (de 67,9 fL. para 72,6fL.).

CONCLUSÃO

A avaliação dos determinantes da efetividade da suplementação com ferro, não pode ser vista separadamente. A grande amplitude de interferentes torna necessário a cooperação de vários profissionais, médicos, farmacêuticos, nutricionistas, assistentes sociais para o sucesso da intervenção.

Existe ótima sensibilidade e especificidade para determinação da anemia ferropriva, utilizando associação de mais de um marcador bioquímico, como Hb-HCM-ST. Porém há necessidade de indicador com maior especificidade na avaliação da suplementação com ferro. O incremento de Hb é indicativo da resposta terapêutica, mas não é suficiente para avaliar os estoques de ferro do organismo e o momento de concluir a suplementação medicamentosa. O HCM é notoriamente o índice com maior sensibilidade na detecção de anemia ferropriva, necessitando maiores estudos da sua correlação com a recuperação dos níveis de ferro corporal, para escolha com maior segurança dos marcadores bioquímicos que devem ser usados para determinação do término dos tratamentos com ferro.

REFERÊNCIAS

1. SZARFARC, S.C. & et al. - Concentração de hemoglobina em crianças do nascimento até um ano de vida. Cad. Saúde Pública, 20(1):266-274, 2004.
2. PIEDRAS, J.; SOLEDAD C.M.; ALVAREZ-HERNANDEZ, X. Usefulness of certain hematologic parameters in the diagnosis of iron deficiency anemia in children and women. Bol. Med. Hosp. Infant Mex., 38(6):911-22, 1981.
3. KOERPER, M.A. & et al.- Developmental change in red blood cell volume: implication in screening infants and children for iron deficiency and thalassemia trait. J. Pediatr., 89(4):580-583, 1976.
4. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. Morbidity and Mortality Weekly Report, 47(RR-3), 1998.

5. DUFFY, T.P. Anemias microcíticas. In: Goldman L.; Benett J (editor). Cecil textbook of medicine. 21 st.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000, p.855-857.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programmer managers. Geneva. Document WHO/NHD/01.3, 2001
7. SILVA L.E.M.; GIUGLIAN, E.R.J. & AERTS, D.R.G.C. - Prevalência e determinantes de anemia em crianças de Porto Alegre, RS, Brasil. Rev. Saúde Pública, 35(1):66-73, 2001
8. TORRES M.A.A.; SATO, K. & QUEIROZ, S.S.- Terapêutica com doses profiláticas de sulfato ferroso como medida de intervenção no combate á carência de ferro em crianças atendidas em unidades básicas de Saúde. Rev. Saúde Pública, 28(6):410-415, 1994
9. ZLOTKIN, S. & et al.- Randomized, Controlled Trial of Single Versus 3-Times-Daily Ferrous Sulfate Drops for Treatment of Anemia. Pediatrics, 108:613-618,2001.
10. HADLER, M.C.; JULIANO, Y. & SIGULEM, D.M.- Anemia do lactente: etiologia e prevalência. J. Pediatr., 78(4): 321-326, 2002.
11. FERREIRA, M.L.M. & et al.- Efetividade da aplicação do sulfato ferroso em doses semanais mo Programa Saúde da Família em Caruaru, Pernambuco, Brasil. Cad. Saúde Pública, 19(2):375-381, 2003.
12. ASLAN, D. & ALTAY, Ç. - Incidence of high erythrocyte count in infants and young children with iron deficiency anemia: re-evaluation of an old parameter. J. Pediatr. Hematol. Oncol., 25(4): 303-306, 2003.
13. WRIGHT, C.M. & et al. - The diagnosis of borderline iron deficiency: results of a therapeutic trial. Arch. Dis. Child., 89(11): 1028-1031, 2004.
14. COOK, J.D.; FLOWERS, C.H. & SKIKNE, B.S. - The quantitative assessment of body iron. Blood., 101(9): 3359-3364, 2003.
15. BRUGNARA, C. & et al. - Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. JAMA., 281(23): 2225-2230, 1999.
16. BRUGNARA, C.- Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. Int.J.Clin.Lab.Res., 28:1-11, 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Irice Luiza Gomes Faria
Caixa Postal 5048 Campus da UFSM
CEP. 97105-900 - Santa Maria - RS

Educação continuada à distância é com a **SBAC**

Navegue pelo portal **SBAC E-Learning**

www.sbac.org.br/ead



A mais perfeita tradução de proximidade!

PRÊMIO HERMES PARDINI DE HORMONOLOGIA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio do Instituto Hermes Pardini;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Hormônios no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho de hormonologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos do prêmio, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2006.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia
Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Freqüência de bactérias gram-negativas em uroculturas de pacientes ambulatoriais, do sistema único de saúde (SUS) de maceió (AL), e sua sensibilidade a antibióticos

Frequency of gram-negative bacteria in cultures of urine from ambulatory patients, of the unified health system (uhs) from maceió (al), and their sensitivity to antibiotics

Anderson Brandão Leite¹, Ana Rachel V. Lima¹, Herbert C. S. Barros¹, Renata B. Leite¹, Istela C. Araújo²; Maria I.V.N. Tadeo & Ana Maria Q. López¹

RESUMO - Este trabalho visou determinar a freqüência e sensibilidade a antibióticos de bactérias Gram-negativas (BGN), isoladas de uroculturas de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), em Maceió (AL), com infecção do trato urinário (ITU), no período de janeiro a julho/2005. Foram conduzidas 1900 uroculturas (inoculação quantitativa), com posterior identificação morfo-bioquímica das bactérias. Constatou-se crescimento em 10,6% (201) das uroculturas, sendo que 169 delas (84,1%) apresentaram BGN's e 32 (15,9%) apresentaram cocos Gram-positivos. Das BGN's, 133 (78,6%) foram identificados como *Escherichia coli*, 18 (10,7%) como *Klebsiella* sp, 11 (6,5%) como *Proteus* sp, 3 (1,8%) como *Enterobacter* sp, 2 (1,2%) como *Citrobacter* sp, e 2 (1,2%) como *Providencia rettigeri*. Dos casos diagnosticados, 85,8% atingiu o gênero feminino. A partir de suspensões dos isolados (104 células.mL⁻¹ de salina estéril), procedeu-se o método de difusão em disco para detectar a sensibilidade a antibióticos. O Imipenem foi o mais eficiente, porém, dentre as drogas de primeira escolha recomendadas pelo CLSI/NCCLS (2005), a Gentamicina apresentou a melhor ação (86,4%), enquanto as menos efetivas foram a Sulfonamida (9,3%), a associação Sulfametoxazol + Trimetoprim (31,6%), a Ampicilina (32,0%) e a Amoxicilina (30,4%), justamente as disponíveis nas farmácias públicas de Maceió.

PALAVRAS-CHAVE - bactérias Gram-negativas; infecção do trato urinário; antibióticos.

SUMMARY - This study aimed to determine the frequency and the sensitivity to antibiotics of Gram-negative bacteria (GNB), isolated from cultures of urine from ambulatory patients of the Unified Health System (UHS), with urinary tract infection (UTI), in Maceió (AL), during the period from January to July/2005. Cultures (1900) of the collected urine were conducted (quantitative inoculation), with subsequent morfo-biochemical identification of the bacteria. Bacteria grew in 201 of the samples (10.6%) and, from these, 169 (84.1%) were GNB and 32 (15.9%) were Gram-positive cocci. Amongst the GNB, 133 (78.6%) were identified as *Escherichia coli*, 18 (10.7%) as *Klebsiella* sp, 11 (6.5%) as *Proteus* sp, 3 (1.8%) as *Enterobacter* sp, 2 (1.2%) as *Citrobacter* sp, and 2 (1.2%) as *Providencia rettigeri*. From the diagnosed cases, 85.8% reached the females. Using suspensions of the isolates (104 células.mL⁻¹ of sterile saline), it was proceeded the method of disk-diffusion to detect the sensitivity to antibiotics. The Imipenem was the most efficient, however, among the drug of first choice recommended by CLSI / NCCLS (2005), Gentamicin showed the best action 86.4%, while the least effective were the Sulfonamid (9.3%), the Sulfamethoxazole association + Trimethoprim (31.6%), the Ampicillin (32.0%) and the Amoxicillin (30.4%) - exactly the ones available in public pharmacies from Maceió.

KEYWORDS - Gram-negative bacteria; Urinary Tract Infection (UTI); antibiotics.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são geralmente atribuídas a microrganismos isolados da urina, na presença ou ausência de sintomas (KLEIN & LONG, 1995), sendo uma situação habitual no atendimento ambulatorial e de pronto-socorro (HOOTON & STAMM, 1991).

As ITU's são muito freqüentes na população, atingem indivíduos de ambos os gêneros e de todas as faixas etárias, embora esteja mais presente em mulheres, onde são observados 20 vezes mais casos de ITU's do que em pacientes do sexo masculino, atingindo picos durante a fase de vida sexual ativa, gestação e menopausa. Para o gênero masculino, o primeiro ano de vida reflete a fase de maior acometimento, podendo-se observar índices de acometimento maiores que as freqüências normalmente observadas nas mulheres (HEILBERG & SCHOR, 2003).

As características clínicas das ITU's dependem do estado do paciente e também do órgão e da extensão atingida pelo microrganismo. Em geral, nos casos de uretrites e cistites ocorrem disúria, poliúria e urgência miccional, sendo

observados episódios de quadro febril em apenas 5% dos casos. Situações mais graves são normalmente vislumbradas quando estão acometidos os rins, geralmente ocorrendo febre, calafrio e dor lombar, além de grande risco para uma septicemia (CHEBABO & BRAVO NETO, 2002; VIEIRA NETO, 2003).

Estudos de Hedin *et al.* (2002), com pacientes idosos, revelaram que em 23% dos casos ocorria bacteriúria assintomática, sendo a incontinência urinária o achado mais freqüente. O mesmo foi constatado por Rodhe *et al.* (2006). Por outro lado, Gorelick & Shaw (2000) relataram que características como temperatura igual ou superior a 39°C sem causa aparente por mais de dois dias, além de idade abaixo de 12 anos e raça branca, podem ser suficientes para diagnosticar ITU em crianças. Já, em recém-nascidos, quadros de icterícia fisiológica prolongada, associada à perda de peso, hipertermia e complicações neurológicas, são sintomas sugestivos desse mesmo diagnóstico (HEILBERG & SCHOR, 2003; VIEIRA NETO, 2003).

A análise laboratorial é relatada como o único e definitivo exame capaz de confirmar uma ITU, visto que evidencia o

Recebido em 03/01/2008

Aprovado em 26/01/2009

¹Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Tab. dos Martins, Maceió-AL, cep:57072-970, bioufal@hotmail.com;

²Laboratório de Análises Clínicas de Maceió (LACLIN) - Hospital Sanatório - Maceió, Alagoas.

crescimento do agente etiológico, além de fornecer meios para identificá-lo (GUIDONI & TOPOROVSKI, 2001; VIEIRA NETO, 2003).

A coleta e o armazenamento da urina são os fatores mais importantes para um correto diagnóstico laboratorial da ITU e, para isto, sugere-se uma análise imediata da urina, porém, no caso de uma impossibilidade, é recomendado um correto armazenamento das amostras, que devem ser mantidas sob refrigeração entre 4 e 6°C (MACHADO *et al.*, 1995; CAMARGO *et al.*, 2001).

Segundo Heilberg & Schor (2003), a coleta da urina realizada a partir do jato médio é considerada satisfatória quando precedida de uma prévia e correta higienização da genitália. Camargo *et al.* (2001) afirmam que as coletas efetuadas por punção suprapúbica, ou aquelas realizadas durante a cistoscopia, são mais fidedignas, geralmente por estarem livres de contaminação.

Entre todas as formas de coleta, o saco coletor representa a técnica com maior índice de contaminação, sendo, desta forma, de grande valia para apenas descartar uma ITU (KOCH & ZUCCOLOTTI, 2003).

Para Machado *et al.* (1995), a bacterioscopia (Gram) bem como alguns testes bioquímicos, como o de esterase leucocitária e produção de nitrato-redutase, são de grande importância, uma vez que podem afastar o diagnóstico de ITU. Segundo Yamasaki (1999), o teste de produção de nitrito possui baixa sensibilidade, apesar de ser altamente específico para bactérias Gram-negativas, exceto para espécies de *Pseudomonas*, que não reduzem nitrato. Além disso, muitas espécies Gram-positivas, como cepas de *Staphylococcus aureus* (cocos Gram-positivos), mostram-se nitrato-redutase positivas, o que dificulta o emprego único deste teste para identificar e diagnosticar ITUs (SATO *et al.*, 2005).

Devido à capacidade de formação de imunocomplexo, a detecção de bactérias responsáveis por pielonefrites pode ser realizada através da técnica de imunofluorescência indireta (YAMASAKI, 1999). Em 2003, Heilberg & Schor confirmaram a grande utilidade desta técnica para constatação de severas ITUs, contudo, direcionam uma maior importância desta para indicação de um possível comprometimento do urotélio, além de alertar contra a possibilidade de obtenção de testes falsos positivos, comumente encontrados em prostatite, cistite hemorrágica e infecções muito recentes, especialmente em crianças.

Yamasaki (1999) relata a possível necessidade do acompanhamento das ITUs através de exames laboratoriais complementares, como o hemograma, a hemossedimentação, a detecção e determinação do conteúdo de proteína C reativa, uréia e de creatinina. Ribeiro Sobrinha *et al.* (2003) indicam o hemograma para a avaliação de pacientes que apresentam suspeita de infecção sistêmica (toxemia), mas para o acompanhamento dos casos mais graves recomendam também as dosagens de uréia, creatinina e íons como Na⁺, K⁺ e Cl⁻.

Em termos gerais, as bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* são os principais microrganismos envolvidos nas ITUs. Destes, a *Escherichia coli* está envolvida na maioria dos casos, estimando-se sua participação em 85% das infecções (YAMASAKI, 1999; HEILBERG & SCHOR, 2003; DIAS NETO *et al.*, 2003).

Ao associarem a sintomatologia das ITUs com seu agente etiológico, Pedraza-Avilés *et al.* (2004) observaram que, entre as infecções sintomáticas, *E. coli* e *Enterobacter cloacae* são espécies responsáveis respectivamente por 71% e 7% dos casos, e entre as infecções assintomáticas, além dos mesmos agentes - *E. coli* (59%) e *E. cloacae* (3%), foram diagnosticadas

também a ocorrência de *Proteus mirabilis* (12%). Entre mulheres, os BGNs são responsáveis pela maioria dos casos de ITU, sendo a *E. coli* e *Klebsiella oxytoca* as duas espécies mais frequentes (POLETTI & REIS, 2005).

Para terapêutica das ITUs, geralmente são adotados antimicrobianos de largo espectro, uma vez que frequentemente são realizados tratamentos empíricos, apontando para drogas com excreção renal que apresentem concentrações parenquimatosa e urinária adequadas. A terapia antibiótica tem o objetivo de eliminar a bacteriúria, o que promove um alívio dos sintomas. Para os casos de pielonefrites, a terapia deve ser adotada precocemente na tentativa de evitar uma possível evolução para sepse (YAMASAKI, 1999). O tratamento precoce é o meio mais eficaz de diminuir a morbimortalidade em crianças, sendo utilizados antimicrobianos de largo espectro por via parenteral, como cefalosporinas de terceira geração associadas ou não a um aminoglicosídeo (ARAP & TROSTER, 2003). Em neonatos e lactentes acometidos por ITUs, o tratamento precoce pode diminuir o alto risco de sepse (RIBEIRO SOBRINHA, 2003). Stein *et al.* (2004) relatam que na maior parte dos casos, o tratamento antimicrobiano oral por três dias é tão efetivo quanto aqueles realizados por períodos mais prolongados, e apontam as quinolonas como uma alternativa que apresenta baixas taxas de resistência. Contudo, afirmam que o tratamento realizado por este período apresenta um maior índice de recidiva.

Segundo Lopes & Tavares (2004), a droga de primeira escolha indicada para o tratamento empírico de ITU aguda não complicada é o Cotrimoxazol (Sulfametoxazol + Trimetoprim), podendo também ser utilizada uma fluoroquinolona, ficando a duração do tratamento condicionada ao acometimento do trato urinário. Indicada como a droga de primeira escolha por vários outros autores (Kavatha *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2006), a associação Sulfametoxazol + Trimetoprim, vem sofrendo perda gradual da sua ação, uma vez que são antibióticos de aplicação mais antiga e, portanto, também de uso indiscriminado (POLETTI & REIS, 2005). Drogas como as Sulfonamidas, Amoxicilina e Ampicilina também vêm induzindo uma resistência significativa nos uropatógenos. Nesses casos, as Cefalosporinas de terceira geração tornam-se a escolha mais acertada (ARAP & TROSTER, 2003). Diante do exposto, o propósito do presente trabalho foi verificar a frequência e suscetibilidade antimicrobiana de bactérias Gram negativas (BGN) isoladas de uroculturas de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no município de Maceió (Alagoas), com infecção do trato urinário (ITU), no período de janeiro a junho de 2005.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de janeiro a julho de 2005, foram analisadas 1900 amostras de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas de Maceió (LACLIM). Para análise dos dados, levou-se em consideração o microrganismo isolado, a idade, gênero (sexo) e indicação clínica do paciente, não havendo associação direta entre o mesmo e as culturas.

Após devidamente esclarecidos quanto aos procedimentos adequados para a obtenção asséptica e representativa das amostras de urina, os pacientes fizeram a coleta em frascos estéreis previamente fornecidos, e estes foram hermeticamente fechados e imediatamente levados ao laboratório. Só foram recebidas amostras coletadas a um intervalo máximo de 90 minutos. Esse material de cada paciente foi, então,

prontamente inoculado (semeadura quantitativa) em meios diferenciais de ágar-CLED (ágar cystine lactose electrolyte deficient) e ágar-MacConkey em placas de Petri, conforme descrito por Oplustil et al. (2004), utilizando-se 10 µL da urina homogeneizada e diluída em salina estéril (cloreto de sódio 0,85 %), numa proporção de 1:100. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (36 ± 1°C, escuro) por um tempo que variou de 18 a 24 h. O resultado da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da urina sem diluição foi obtido multiplicando-se o número de colônias pelo fator de correção (10.000).

Foram consideradas positivas as culturas que apresentaram um crescimento maior que 10⁵ UFC.mL⁻¹ de urina. Aquelas com um crescimento menor do que esse, só foram consideradas positivas quando a lâmina corada pela técnica de Gram evidenciou a presença de vários polimorfonucleares acompanhada de um número considerável de bactérias por campo de imersão. O odor fétido da urina também era uma característica por vezes considerada, quando da presença dos demais sinais descritos.

Para identificação dos BGN's isolados, foram empregados testes bioquímicos capazes de demonstrar a fermentação de três glicídeos (glicose, sacarose e lactose), evidenciar a utilização do citrato como única fonte de carbono e a descarboxilação da lisina, a produção de urease, Indol, H₂S e CO₂, e determinar a possibilidade de motilidade ou não, conforme descrito por Silva (1996).

O antibiograma foi realizado utilizando o meio ágar-Müller-Hinton pelo método de difusão em disco (SILVA, 1996). O preparo do inóculo foi realizado a partir das colônias isoladas em ágar-MacConkey (24 h), preparando-se uma suspensão de células em solução salina estéril (cloreto de sódio 0,85 %), ajustada de acordo com a escala de McFarland (1-2 X 10⁸ UFC.mL⁻¹). Os discos empregados no antibiograma foram fabricados pela Laborclin®, e estão listados com sua respectiva concentração na Tabela 01. A análise dos halos de inibição seguiu os critérios adotados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards)* (CLSI/NCCLS, 2005).

A ação antimicrobiana, verificada através do diâmetro dos halos nos antibiogramas, foi classificada como resistente ou sensível. Aquela bactéria que apresentou halos na faixa intermediária foi reportada como resistente a droga, uma vez que, segundo a CLSI/NCCLS (2005), o agente antimicrobiano que apresenta uma ação intermediária possui Concentração Inibitória Mínima - CIM próxima aos níveis sanguíneos e tissulares alcançados, para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas que seriam obtidas caso o isolado houvesse apresentado sensibilidade ao teste. Os dados obtidos foram analisados utilizando o pacote estatístico EPIINFO versão 6.04 (DEAN et al., 1996). O χ^2 (Qui-quadrado) e a prova exata de Fisher, e o teste "t" de Student foram utilizados para comparar proporções e médias respectivamente, dentro de intervalos de confiança (IC), sendo os riscos relativos estimados pela razão de chances, conhecida como "odds ratio" ou "OR" (KAHN & SEMPOS, 1989).

RESULTADOS

Das 1900 uroculturas, 201 (10,6%) apresentaram resultado positivo. Entre as culturas positivas, 32 (15,9%) apresentaram crescimento de bactérias Gram-positivas, enquanto que 169 (84,1%) corresponderam a BGN's.

Entre os 169 pacientes (4 meses a 83 anos de idade) cujas uroculturas apresentaram crescimento de BGN's, a média etária geral foi de 35,6 ± 21,7 anos, sendo que 24 (14,2%) deles pertenciam ao gênero masculino, com média de idade de 34,9 ± 25,4 anos, e 145 (85,8%) pertenciam ao

gênero feminino, com média de idade de 35,7 ± 21,1. Portanto, o gênero feminino apresentou uma frequência de ITU's provocadas por BGN's seis vezes maior do que o gênero masculino.

A faixa etária onde as ITU's causadas por BGN's foram mais ocorrentes é a que oscilou entre 15 e 34 anos, correspondendo a 30,8% dos casos diagnosticados. A maioria dos resultados positivos em todas as faixas-etárias foi constatada no gênero feminino, sendo que o grupo de jovens entre 5 e 14 anos apresentou maior semelhança com o de mesma faixa etária no gênero masculino (Tabela 02).

Entre os BGN's isolados (n=169) e mencionados na Tabela 03, os mais frequentes foram *Escherichia coli* (133 culturas = 78,7%), *Klebsiella* sp (18 culturas = 10,7%) e *Proteus* sp (11 culturas = 6,5%). Considerando o total de culturas positivas (n=201), *E. coli* foi responsável por 66,2% (133) das ITU's.

Das drogas testadas nos TSA's, a que ofereceu menor ação frente às cepas isoladas foi a Sulfonamida, sendo ativa em apenas 9,3% dos BGN's testados (Tabela 04). A ação antimicrobiana apresentada pela associação Sulfametoxazol + Trimetoprim (SMX-TMP) foi de 31,6%, semelhante àquela verificada entre as penicilinas Amoxicilina (30,4%) e Ampicilina (32,0%) (Tabela 04).

Dos antimicrobianos testados na pesquisa, o Imipenem apresentou melhor ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de 99,3% dos BGN's testados, sendo um isolado da espécie *Enterobacter aerogenes* o único resistente.

Entre as drogas de primeira escolha recomendada pelo CLSI/NCCLS (2005), a Gentamicina, pertencente à classe dos aminoglicosídeos, foi a que mais se destacou, inibindo o crescimento de 86,4% dos microrganismos submetidos ao TSA. Em seguida, a Cefalotina – cefalosporina de primeira geração – apresentou ação contra 57,8% dos bastonetes testados, e a Ampicilina, da classe das penicilinas, inibiu apenas 32% dos BGN's testados.

TABELA I

Discos de antibióticos (com suas respectivas concentrações) utilizados nos testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) com bastonetes Gram-negativos (BGN's) isolados das amostras de urina de pacientes ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Maceió (AL), no período de janeiro a junho/2005.

ANTIBIÓTICOS	CONC.(µg)	ANTIBIÓTICOS	CONC.(µg)	ANTIBIÓTICOS	CONC.(µg)
Ácido nalidíxico	30	Cefalotina	30	Nitrofurantoina	300
Ácido pipemídico	20	Cefoxitina	30	Norfloxacina	10
Amicacina	30	Ceftazidima	30	Pefloxacina	5
Amoxicilina	10	Iprofloxacin	5	Tetraciclina	30
Ampicilina	10	Cloranfenicol	30	Tobramicina	10
Aztreonam	30	Gentamicina	10	Sulfazotrim	25
Ceftriaxona	30	Imipenem	10	Sulfonamidas	300

TABELA II

Frequência de pacientes com infecção do trato urinário (ITU's) provocada por bastonetes Gram-negativos (BGN's) atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Maceió-AL, estratificado por gênero e faixa-etária (janeiro a junho/2005).

FAIXA ETÁRIA (ANOS)	FREQÜÊNCIA				
	♂	Absoluta ♀	Total	Relativa (%)	
< 1	1	3	4	25,0	75,0
1 - 4	1	13	14	7,1	92,9
5 - 14	5	8	13	38,5	61,5
15 - 24	4	22	26	15,4	84,6
25 - 34	2	24	26	7,7	92,3
35 - 44	1	17	18	5,6	94,4
45 - 54	4	21	25	16,0	84,0
55 - 64	3	20	23	13,0	87,0
> 65	3	2	25	20,0	80,0
Ignorados	---	5	5	---	100,0
Total	24	145	169	14,2	85,8

TABELA III
Frequência de bastonetes Gram-negativos (BGN's) isolados de uroculturas de pacientes com infecção do trato urinário (ITU's) atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Maceió-AL (janeiro a junho/2005).

MICROORGANISMOS	FREQÜÊNCIA		
	Absoluta	Relativa (%)	Relativa acumulada (%)
<i>Escherichia coli</i>	133	78,6	78,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	10,1	88,7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,6	89,3
<i>Proteus mirabilis</i>	10	5,9	95,2
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,6	95,8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	1,2	97,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,6	97,6
<i>Providencia rettigeri</i>	2	1,2	98,8
<i>Citrobacter diversus</i>	1	0,6	99,4
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,6	100,0
Total	169	100,0	----

TABELA IV
Perfil de resistência e sensibilidade apresentado pelos bastonetes Gram-negativos (BGN's) isolados de uroculturas de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Maceió-AL (janeiro a junho/2005), estratificado por classe de antimicrobianos.

CLASSE	ANTIBIÓTICOS	TOTAL	RESULTADOS	
			Resistentes Nº (%)	Sensíveis Nº (%)
Aminoglicosídeos	Amicacina	86	7 (8,1)	79 (91,9)
	Gentamicina	169	23 (13,6)	146 (86,4)
	Tobramicina	134	20 (14,9)	114 (85,1)
Cefalosporinas	Ceftriaxona	169	6 (3,6)	163 (96,4)
	Cefalotina	116	49 (42,2)	67 (57,8)
	Cefoxitina	164	23 (14,0)	141 (86,0)
	Ceftazidima	154	5 (3,2)	149 (96,8)
Carbapeneno	Imipenem	149	1 (0,7)	148 (99,3)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	117	18 (15,4)	99 (84,6)
	Norfloxacina	159	21 (13,2)	138 (86,8)
	Pefloxacino	168	26 (15,5)	142 (84,5)
Fenicóis	Cloranfenicol	103	17 (16,5)	86 (83,5)
Monobactâmico	Aztreonam	164	6 (3,7)	158 (96,3)
Nitrofurantoina	Nitrofurantoina	160	29 (18,1)	131 (81,9)
Penicilinas	Amoxicilina	168	117 (69,6)	51 (30,4)
	Ampicilina	169	115 (68,0)	54 (32,0)
Quinolonas	Ácido nalidixico	169	41 (24,3)	128 (75,7)
	Ácido pipemídico	147	36 (24,5)	111 (75,5)
Sulfonamidas	Sulfonamida	107	97 (90,7)	10 (9,3)
Tetraciclina	Tetraciclina	154	82 (53,2)	72 (46,8)
Associação	Sulfametoxazol+Trimetoprim	57	39 (68,4)	18 (31,6)

DISCUSSÃO

A incidência de uroculturas positivas deste trabalho assemelhou-se àquela detectada por Chaves *et al.* (2003) na cidade de Crateús-Ceará, onde tais autores verificaram que 14% das amostras de urina estudadas apresentaram positividade para algum patógeno bacteriano. Dados publicados por Dias Neto *et al.* (2003) também apontaram que 86,4% das ITU's em pacientes ambulatoriais do Hospital das Clínicas (FMRP-USP) como sendo provocadas por BGN's, sendo que a média de idade dos mesmos era de 45,3 ± 23,5, isto é, significativamente mais avançada do que a constatada no presente estudo (35,6 ± 21,7 anos, p<0,00001). Verificou-se não haver diferença significativa (p>0,05) entre as médias de idade apresentadas pelos dois gêneros neste estudo (masculino: 34,9 ± 25,4 anos; feminino: 35,7 ± 21,1 anos).

Comparando-se a proporção de pacientes positivos do gênero masculino, na faixa-etária de 5 a 14 anos, com aquela dos demais grupos (Tabela 02), verifica-se que estes apresentaram 4,5 vezes mais chances de desenvolver ITU por BGN's do que aqueles de outras idades [OR: 4,5 (IC 95%: 1,14 – 17,46); Fisher exact: p=0,02].

No primeiro ano de vida, a maior parte das ITU's diagnosticadas neste trabalho ocorreu no sexo feminino, no entanto, estudos de Vieira Neto (2003) demonstraram uma maior frequência das ITU's nessa idade entre meninos. Já entre os pré-escolares, o mesmo autor, relata uma frequência de ITU de 10 a 20 vezes maior nas mulheres do que nos homens, o que se pôde constatar neste estudo (Tabela 02).

Com relação à frequência dos BGN's isolados, em pesquisa realizada com pacientes ambulatoriais da cidade de Goiânia-Goiás por Poletto & Reis (2005), e em estudo efetuado com pacientes atendidos pelo Hospital Universitário de Brasília – DF por Pires *et al.* (2005), o mesmo resultado foi observado quando considerados os três microrganismos mais frequentes (Tabela 03).

Neste estudo, das 201 culturas positivas, *E. coli* foi responsável por 66,2% (133) das infecções, resultado similar ao de outros autores, que relatam frequência desta espécie entre 58 e 85% dos casos de ITU (DIAS NETO *et al.*, 2003; AGRA *et al.*, 2004; POLETTO & REIS, 2005; LOPES & TAVARES, 2005; PIRES *et al.*, 2005). De acordo com o cálculo de riscos relativos estimados, as ITU's deste estudo, causadas por BGN's, possuíam 13 vezes mais chances de apresentar a *E. coli* como seu agente etiológico do que um dos outros microrganismos isolados ($\chi^2=109,07$; p<0,000001; IC 95%: 7,86 – 23,83).

Enterobacter spp., *Citrobacter spp.* e *Providencia rettigeri* foram os patógenos menos frequentes entre os pacientes avaliados (Tabela 03), o que coincide com os resultados obtidos por Poletto & Reis (2005), que, entre 67 BGN's isolados, verificaram apenas 2 culturas com *Citrobacter sp* (2,9%) e uma com *Enterobacter sp* (1,5%).

Em 2003, Chaves *et al.* detectaram sensibilidade a Sulfonamida de apenas 13% entre diferentes cepas de BGN's, não havendo diferença significativa (Fisher exact: p>0,05) dos resultados obtidos no presente estudo (Tabela 04). Com relação à ação da Ampicilina e da Amoxicilina (Tabela 04), a resistência dos BGN's estudados mostrou-se semelhante àquela observada respectivamente nos estudos de Chaves *et al.* (2003) e Poletto & Reis (2005).

O Imipenem, em conformidade com os dados da literatura específica, mostrou-se o mais eficiente antibiótico testado contra a maioria dos isolados associados às ITU's diagnosticadas no período desta pesquisa. Segundo Dias Neto *et al.* (2003), o Imipenem revelou atividade antibiótica contra 96% das cepas testadas em seus estudos. Kiffer *et al.* (2006; 2007) também verificaram que cepas de *E. coli* e *Klebsiella sp* isoladas de urina apresentaram, respectivamente, 100% e 99,2% de sensibilidade a esse antibiótico.

Entre as cefalosporinas de terceira geração (Ceftazidima e Ceftriaxona) testadas, não houve diferença significativa em sua ação antimicrobiana ($\chi^2<3,84$; p>0,05). Dados semelhantes foram relatados em 2005 por Poletto & Reis, cujos BGN's isolados das uroculturas alvo de seus estudos apresentaram 94% de sensibilidade a Ceftazidima. No entanto, Kiffer *et al.* (2005) relataram uma baixa sensibilidade apresentada por cepas de *K. pneumoniae* (48,1%), apesar de isolados de *E. coli* terem revelado menor sensibilidade (85,4%). Entre os aminoglicosídeos utilizados neste trabalho, a

REFERÊNCIAS

Amicacina apresentou melhor ação antibacteriana (91,9%), semelhante ao observado por Pires et al. (2005), que relataram ação bactericida para esta droga de 98,6% contra *E. coli* e 90,9% contra *Klebsiella* sp. As atividades antibacterianas de fluorquinolonas testadas nesta pesquisa foram similares, o que também está de acordo com os dados publicados por Poletto & Reis (2005).

No que se refere às drogas recomendadas como sendo de primeira escolha (CLSI/NCCLS, 2005) para os casos de ITU's, verificou-se uma concordância deste estudo com o trabalho de Dias Neto et al. (2003), uma vez que suas análises revelaram ações bactericidas da Gentamicina, Cefalotina e Ampicilina da ordem de 88%, 51% e 37%, respectivamente. Comparando-se estatisticamente os resultados obtidos com as drogas de primeira escolha (Qui-quadrado), verificou-se uma diferença significativa entre as eficiências apresentadas ($\chi^2=103,45$; $p<0,0000001$).

A sensibilidade dos BGN's isolados frente à Ampicilina e à Gentamicina, revelou que a primeira teve 13 vezes mais chances de não atuar no controle desses microrganismos, isto é, não eliminar o agente etiológico da ITU, do que ocorreu com a Gentamicina [OR: 13,52 (IC95%: 7,58 – 24,28); $\chi^2=101,41$; $p<0,0000001$]. Da mesma forma, com relação à Cefalotina, um tratamento empírico poderia conduzir ao não combate da ITU em até quatro vezes, quando comparado ao tratamento com a Gentamicina [OR: 4,64 (IC95%: 2,52 – 8,59); $\chi^2=28,37$; $p<0,0000001$]. Por fim, se a Ampicilina fosse indicada para o tratamento sem o conhecimento de seu perfil antimicrobiano frente às cepas de BGN's isoladas, as chances de não se curar a ITU aumentaria em até 3 vezes em comparação com o uso da Cefalotina [OR: 2,91 (IC95%: 1,73 – 4,90); $\chi^2=17,71$; $p<0,00001$].

Analisando-se o perfil de resistência dos três gêneros de BGN's mais freqüentes neste estudo (Tabela 03), verificou-se que houve uma diferença significativa entre as chances dos mesmos apresentarem resistência a alguma droga ($\chi^2=33,96$; $p<0,0000001$). Contudo, comparando-se apenas os isolados de *E. coli* com os de *Klebsiella* sp, observa-se que não há diferença significativa entre o comportamento de ambos frente aos antimicrobianos testados ($\chi^2<3,84$; $p>0,05$).

No tocante aos isolados de *Proteus* sp, verificou-se que apresentaram praticamente as mesmas chances de *Klebsiella* sp [OR: 2,44 (IC95%: 1,65 – 3,61); $\chi^2=21,4$; $p<0,00001$], e 2 vezes mais chances do que *E. coli* [OR: 2,32 (IC95%: 1,71 – 3,16); $\chi^2=31,9$; $p<0,0000001$] de resistirem a algum dos fármacos utilizados. Portanto, o gênero *Proteus* apresenta uma maior resistência entre os patógenos mais incidentes em ITU's.

Entre as drogas que apresentaram menor atividade contra os isolados estão as Sulfonamidas (9,3%), a associação Sulfametoxazol + Trimetoprim (31,6%) e as penicilinas Ampicilina (32,0%) e Amoxicilina (30,4%), reações próximas às detectadas por Agra et al. (2004) em microrganismos isolados de pacientes hospitalares de Santa Cruz do Sul, no Rio Grande do Sul, mas não com microrganismos isolados de pacientes ambulatoriais. Desta forma, a recomendação de tratamento empírico de ITU apresentada por Lopes & Tavares (2004), que indica o Cotrimoxazol (Sulfametoxazol + Trimetoprim) como a droga de escolha no tratamento de ITU's, deve ser questionada, uma vez que a maior parte dos isolados detectados neste estudo apresentou resistência a essa droga. Assim, fica uma vez mais explícita a importância de se avaliar as taxas locais de resistência como uma das etapas básicas para o estabelecimento de estratégias no uso racional de antimicrobianos.

1. AGRA, H.; MORALES, J.V.; RENNER, J.P.; ROCHA, M.P.; VALIM, A.M.; REMONATTO, G.; BARTH, A.; BARROS, E. - Prevalência de resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos mais utilizados para o tratamento da infecção urinária. *J. Bras. Nefrol.*, 26(2):157 (R.423), 2004.
2. ARAP, M.A. & TROSTER, E.J. - Infecção urinária em crianças: uma revisão sistemática dos aspectos diagnósticos e terapêuticos. *Einstein*. 1: 26-29, 2003.
3. BAUER, A.W. & KIRBY, E.M. - Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
4. CAMARGO, I.L.; BARATELLA, C.; MASCHIETO, A.; SALVINO, C.; DARINI, A.L.C. - Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário: uma revisão técnica. *Rev. Medicina*. 34(1): 70-78, 2001.
5. CHAVES, J.M.; MOREIRA, A.A.; CUNHA, F.A.; CARVALHO, M.J.P. & MENEZES, E.A. - Perfil de resistência e sensibilidade dos antimicrobianos utilizados em infecções urinárias no Hospital de Referência São Lucas da cidade de Crateús- Ceará. *Rev. Bras. An. Clín.*, 35(supl): 38B, 2003.
6. CHEBABO, A. & BRAVO NETO, G.P. - Uso racional de antibióticos na infecção urinária do paciente cirúrgico. In: Programa de Atualização de Uso de Antibióticos em Cirurgia – Farmácia/Pfizer, 1(4): 4-8, 2002.
7. CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute/antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards. - Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. 23 (1): Norma M2-A8, 8ª. Ed. Wayne, Pa, EUA, 2005, 58p.
8. DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; BURTON, A. H. & DICKER, R. C. - EPIINFO, Versão 6.03: A Word Processor, Database and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta: Centres for Disease Control and Prevention, 1996.
9. DIAS NETO, J. A.; MARTINS, A.C.P.; SILVA, L.D.M.; TIRABOSHI, R.B.; DOMINGOS, A.L.A.; COLOGNA, A.J.; PASCHOALIN, E.L.; TUCCI JR, S. - Infecção Urinária Comunitária: etiologia e sensibilidade bacteriana. *Revista Acta Cirúrgica Bras.*, 18 (1): 33-36. 2003a.
10. DIAS NETO, J. A.; SILVA, L.D.M.; MARTINS, A.C.P.; TIRABOSHI, R.B.; DOMINGOS, A.L.A.; SUAID, H.J.; TUCCI JR, S.; COLOGNA, A.J. - Prevalência e susceptibilidade bacteriana da infecção urinária hospitalar. *Revista Acta Cirúrgica Bras.*, 18(5): 36-38. 2003b.
11. GORELICK, M.H. & SHAW, K.N. - Clinical decision rule to identify febrile young girls at risk for urinary tract infection. *Arch. Pediat. & Adol. Medic.*, 154(4):386-90, 2000.
12. GUIDONI, E.B.M.; TOPOROVSKI, J. - Infecção urinária na adolescência. *J. Pediatria*, Rio de Janeiro, 77(2): 165-169, 2001.
13. HEDIN, K.; PETERSSON, C.; WIDEBACK, K.; KAHLMETER, G.; MOLSTAD, S. - Asymptomatic bacteriuria in a population of elderly in municipal institutional care. *Scand. J. Prim. Health Care*. 20:166-168, 2002.
14. HEILBERG, I.P. & SCHOR, N. - Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – ITU. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, São Paulo, 49(1): 2003.
15. HOOTON, T.M. & STAMM, W.E. - Management of acute uncomplicated urinary tract infection in adults. *Med. Clin. North Am.*, 75: 339-358, 1991.
16. KAHN, H.A. & SEMPOS, C.T. - Statistical methods in epidemiology. New York: Oxford University Press, 1989, 292 p.
17. KAVATHA, D.; GIAMARELLOU, H.; ALEXIOU, Z.; VLACHOGIANNIS, N.; PENTEA, S.; GOZADINOS, T.; POULAKOU, G.; HATZIPAPAS, A.; KORATZANIS, G. - Cefpodoxime-proxetil versus trimethoprim-sulfamethoxazole for short term therapy of uncomplicated acute cystitis in women. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 897-900, 2003.
18. KIFFER, C.R.; MENDES, C.; OPLUSTIL, C.P. & SAMPAIO, J.L. - Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from a major urban city. *Int. Braz. J. Urol.* 33(2): 267-9, 2007.
19. KIFFER, C.R.V.; KUTI, J.L.; EAGYE, K.J.; MENDES, C.; NICOLAU, D.P. - Pharmacodynamic profiling of imipenem, meropenem and ertapenem against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 28(4): 340-4 2006.
20. KIFFER, C.R. HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.P.; SAMPAIO, J.L.; SAKAGAMI, E.;

- TURNER, P.; MENDES, C. - Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz. J. Infect. Dis.* 9(3): 216-24, 2005.
21. KLEIN, J.O. & LONG, S.S. - Bacterial infections of the urinary tract. In: REMINGTON J.S & KLEIN J.O, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn*. 4th ed. Philadelphia, Saunders, 1995. p. 925-34.
22. KOCH, V.H & ZUCCOLOTTO, S.M.C. - Infecção do trato urinário - em busca das evidências. *J Ped.* 79 (supl.1): 97-106, 2003.
23. LOPES, H.V. & TAVARES, W. - Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, São Paulo, 51(6): 2005.
24. LOPES, H.V. & TAVARES, W. - Infecções do trato urinário não complicadas: tratamento. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, Sociedade Brasileira de Infectologia e Sociedade Brasileira de Urologia. 2004. 11p.
25. MACHADO, B.M.; PAHL, M.M.C.; BETTA, S.L.; EJSBERG, B.; BALDACCI, E.; OKAY, Y. - Análise dos métodos diagnósticos para infecção urinária. *Pediatria (São Paulo)*, 17(1): 42-46, 1995.
26. OPLUSTIL, C.P.; ZOOCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. - *Microbiologia Clínica*. 2ª ed., São Paulo, Sarvier, 2004.
27. PEDRAZA-AVILÉS, A.G.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, G. & PONCE-ROSAS, R.E. - Frequency, risk factors and vaginal colonization due to *Escherichia coli*. *Ginecol Obstet Mex.* 72:68-75, 2004.
28. PIRES, M.C.; FROTA, K. & SILVEIRA, C.A.N. - Prevalência e suscetibilidade bacteriana das infecções comunitárias do trato urinário no Hospital Universitário de Brasília, de 2001 a 2005. In: Livro de Resumos da IX Jornada Científica do Hospital Universitário de Brasília, 9: 1, 2005
29. POLETO, K. Q. & REIS, C. - Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, GO. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.38, no.5, p.416-420, 2005.
30. RIBEIRO SOBRINHA, E.L.; MELLO, L.F.; HIRSHHEIMER, M.R. & BENINI, V. - Protocolo sobre infecção do trato urinário (ITU). Protocolo de Assistência Médico- Hospitalar (Infecções Urinárias) do Hospital Municipal Infantil Menino Jesus, Prefeitura Municipal de São Paulo, 2003, 7p.
31. RODHE, N.; MÖLSTAD, S.; ENGLUND, L.; SVÄRDSUDD, K. - Asymptomatic bacteriuria in a population of elderly residents living in a community setting: prevalence, characteristics and associated factors. *Fam. Pract.* 23(3): 303-7, 2006.
32. SATO, A.F.; SVIDZINSKI, A.E.; CONSOLARO, M.E.L.; BOER, C.G. - Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. *J. Bras. Patol. & Méd. Lab.*, Rio de Janeiro, 41(6): 397-404, 2005.
33. SILVA, N. - Testes bioquímicos para a identificação de bactérias em alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Campinas. 1996.
34. STEIN, A.; BEHAR, P.; CUNHA, C.R.H.; PELLEGRIN, L.; FERREIRA, J.A.S. - Uso racional de antibióticos para médicos de atenção primária. *Rev. da Assoc. Méd. do R. Grane do Sul.* 48(2): 73-152, 2004.
35. VIEIRA NETO, O.M. - Infecção do trato urinário. *Med.*, Ribeirão Preto, 36: 365-369, 2003.
36. YAMASAKI, R. - Infecções urinárias inespecíficas. In: SBU- Guia Prático de Urologia. São Paulo: BG Cultural, 1999, p. 113-117.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof.ª Ana Maria Q. Lopes
Univ. Fed. de Alagoas - BR-104 Km 97
CEP: 57082-970 - Maceió - AL

De 14 a 18 de junho de 2009

36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

9º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

Centro de Eventos FIERGS

Porto Alegre - RS

www.cbac.org.br

Prevalência do traço talassêmico beta em indivíduos com microcitose

Prevalence of trait beta thalassaemic in individuals with microcytosis

Ralfo Cavalcanti de Medeiros¹, Raline dos Santos da Silva², Valéria Cristina Ribeiro Dantas³,
Tereza Maria Dantas de Medeiros⁴

RESUMO - A talassemia beta é caracterizada por uma alteração quantitativa da síntese da globina beta resultando em redução (β^+ talassemia) ou ausência (β^0 talassemia) de cadeias. O traço talassêmico beta resulta da heterozigose de uma das mutações que afetam a síntese das cadeias beta. Com o objetivo de determinar a prevalência do traço talassêmico beta em indivíduos com microcitose foram analisadas 86 amostras de sangue com valor de VCM inferior a 80 fL. Foram realizados os seguintes exames: eritrograma, contagem de reticulócitos, eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, dosagens de Hb A₂, Hb Fetal, ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro e saturação da transferrina. Foram identificados 2 portadores de traço talassêmico beta representando uma prevalência de 2,3 %. Apenas um paciente com traço talassêmico beta tinha anemia e nenhum deles apresentava deficiência de ferro enquanto que entre os 84 pacientes com níveis normais de Hb A₂, 27 (32,1 %) não tinham anemia nem deficiência de ferro. A concentração média de Hb A₂ e VCM dos pacientes com traço talassêmico beta foi $5,0 \pm 0,8$ % e $69,5 \pm 6,5$ fL respectivamente. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de posterior estudo molecular a fim de investigar não só as mutações no gene beta, mas a presença de talassemia alfa em nossa população.

PALAVRAS-CHAVE - Traço talassêmico beta, hemoglobina A₂, microcitose.

SUMMARY - The beta thalassemias constitute an heterogeneous group of disorders characterized by a quantitative alteration in the synthesis of the beta globin, resulting in reduction (β^+ thalassemia) or absence (β^0 thalassemia) of chains. The beta thalassaemic trait results of an heterozygosis from one of the mutations that affects the synthesis of the beta chains. In order to determine the prevalence of the beta thalassaemic trait in individuals bearing microcytosis, 86 samples presenting MCV values lower than 80 fL were analyzed. The following analyses were conducted: determination hematological parameters, reticulocytes count, hemoglobin electrophoresis in alkaline pH, Hb A₂, Fetal hemoglobin, serum ferritin and serum iron determination, total iron binding capacity and transferrin saturation. Two beta thalassaemic trait individuals have been identified, which represent the prevalence of 2,3 %. Only one of the patients with beta thalassaemic trait had anemia and none of them presented iron deficiency. In the other hand, between the 84 patients wich had normal Hb A₂ values, 27 (32,1 %) had not anemia nether iron deficiency. The average concentration of Hb A₂ and MCV in beta-thalassaemic patients was $5,0 \pm 0,8$ % and $69,5 \pm 6,5$ fL respectively. The results accomplished suggest the need of later molecular study, so not only gene beta mutations are investigated, but also the alpha thalassemia presence in our population.

KEYWORDS - beta thalassaemic trait, hemoglobin A₂, microcytosis.

INTRODUÇÃO

As talassemias compreendem um diversificado grupo de distúrbios genéticos e são caracterizadas pela redução ou ausência na produção de uma ou mais cadeias de globina. As talassemias beta constituem um grupo heterogêneo de doenças, caracterizadas por uma alteração quantitativa da síntese de globina beta, resultando em redução (β^+ talassemia) ou ausência (β^0 talassemia) de cadeias (Cao *et al.*, 1997; Weatherall & Clegg, 1999). Mais de 200 diferentes mutações foram identificadas no gene da beta globina, onde as mutações pontuais devido a substituição de uma única base, inserção ou deleção de poucas bases são as causas mais comuns (Weatherall & Clegg, 2001).

O desequilíbrio nas cadeias de globina é responsável pela gravidade das síndromes talassêmicas. A eritropoese ineficaz é o principal determinante da anemia seguida pela hemólise de eritrócitos no sangue periférico contendo inclusões de cadeias alfa e a redução na síntese da hemoglobina com formação de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos que são mecanismos secundários (Galanello & Cao, 1998).

Nas síndromes talassêmicas são observadas três condições clínicas e hematológicas: o traço talassêmico

beta (β^0/β ou β^+/β), a talassemia intermédia (β^0/β^+ ou β^+/β^+) e a talassemia maior (β^0/β^+ ou β^+/β^+) onde as duas últimas resultam da homozigose dos alelos da talassemia beta (Cao *et al.*, 1997).

O traço talassêmico beta é caracterizado hematologicamente por microcitose e hipocromia com níveis reduzidos de VCM e HCM, moderada reticulocitose, policromatofilia e ponteadado basófilo. A concentração do ferro sérico é usualmente normal ou aumentada, assim como a concentração da ferritina sérica. O achado laboratorial característico no traço talassêmico beta é o aumento da concentração da hemoglobina A₂ (Madan *et al.*, 1998; Shine, 1997).

A microcitose no traço talassêmico beta é decorrente da formação deficiente de hemoglobina, por redução da síntese de cadeias beta e aumento na produção de cadeias alfa que precipitam nos precursores eritrocitários levando à destruição precoce podendo induzir a anemia. Os portadores de traço talassêmico beta, devido a microcitose e discreta anemia, são comumente tratados com medicamentos ferrosos e, em casos de tratamentos prolongados, podem eventualmente resultar em acúmulo de ferro com possíveis alterações clínicas e laboratoriais (Sonati *et al.*, 1993; Thein, 2004).

Recebido em 13/02/2001

Aprovado em 26/01/2009

¹Professor da disciplina Hematologia Clínica, Universidade Potiguar, Mestrando do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; ²Bolsista de Iniciação Científica; ³Farmacêutica Bioquímica, Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Potiguar; ⁴Professor Adjunto da disciplina Hematologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

O diagnóstico diferencial entre a anemia por deficiência de ferro e o traço talassêmico beta pode ser feito pela utilização da dosagem de Hb A₂ associada à dosagem de ferro sérico, ferritina sérica, capacidade total de ligação do ferro, saturação da transferrina e zinco-protoporfirina (Madan *et al.*, 1998; Van Zeben *et al.*, 1990).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência do traço talassêmico beta em indivíduos que apresentam microcitose e verificar a presença de anemia e deficiência de ferro entre os indivíduos com e sem talassemia beta.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 86 indivíduos de ambos os sexos com idades variando de 2 a 55 anos (15,0 ± 12,7 anos) atendidos no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Potiguar. O critério de escolha foi a presença de microcitose definida com valor de volume corpuscular médio (VCM) inferior a 80 fL. Foram utilizados como critérios de exclusão: crianças com idade inferior a 2 anos, uso de alguma medicação que continha ferro, transfusões sanguíneas nos últimos seis meses e portadores de doenças crônicas.

O grupo controle foi constituído de 48 indivíduos de ambos os sexos com idades variando de 3 a 51 anos (20,2 ± 14,7 anos) que não apresentavam microcitose (VCM = 80 a 100 fL) e tinham *status* de ferro normal.

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e todos os indivíduos participantes da pesquisa (grupo de estudo e controle) ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após serem informados sobre o protocolo de estudo.

A coleta das amostras foi realizada com o paciente em jejum de 8 horas. Foram colhidos 8 mL de sangue por punção venosa e distribuídos em 2 tubos de ensaio: um tubo contendo anticoagulante (EDTA) e outro tubo sem anticoagulante para a obtenção de soro. O sangue colhido com anticoagulante foi utilizado para a realização dos seguintes exames: eritrograma realizado em contador automático de células ADVIA 60 (Bayer), contagem de reticulócitos (Dacie & Lewis, 1995), eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,5 (Dacie & Lewis, 1995), dosagem de hemoglobina A₂ (Bezerra, 1984) e dosagem de Hb Fetal (Betke *et al.*, 1959). Todos os exames foram realizados dentro de 24 horas após a coleta. As amostras que apresentaram concentração de HbA₂ acima de 3,7% foram confirmadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando o analisador automático Variant II (Bio-Rad).

O soro foi obtido a partir do sangue sem anticoagulante após centrifugação a 600 g por 15 minutos e estocado a -20° C até a determinação dos parâmetros bioquímicos: dosagens de ferritina sérica (kit AxSYM Ferritina - Abbott Laboratories), ferro sérico (Ferrimat Kit - bioMérieux), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) (kit TIBC - bioMérieux) e saturação da transferrina (cálculo da relação entre a concentração de ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro).

A análise estatística foi baseada em cálculos percentuais das variáveis qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foi calculada a média e o desvio padrão.

Para comparação dos grupos foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis (Anova) para n desigual, com nível de significância de 5% em todos os casos.

RESULTADOS

Dos 86 pacientes analisados 2 eram portadores do traço talassêmico beta representando uma prevalência de 2,3 %. Os pacientes foram agrupados de acordo com o nível de hemoglobina A₂ e presença ou ausência de anemia e de deficiência de ferro (Figura 1).

Os valores de Hb A₂ dos dois pacientes com traço talassêmico beta foram 5,5 % e 4,4 % com um valor médio de 5,0 ± 0,8 %. A concentração média da Hb A foi 94,4 ± 0,1 % nos pacientes com traço talassêmico beta enquanto que entre os pacientes não talassêmicos a Hb A variou entre 96,8 ± 0,7 % a 97,2 ± 0,7 % (Tabela 1).

Os valores do VCM dos dois pacientes com traço talassêmico beta foram 63,0 fL e 75,9 fL com nível médio de 69,5 ± 6,5 fL. O valor médio de VCM mais reduzido foi observado nos pacientes com Hb A₂ normal que apresentavam anemia e deficiência de ferro. Entre os pacientes que não apresentavam anemia os valores médios de VCM foram 75,8 ± 2,1 fL e 76,1 ± 3,5 fL (Tabela 2).

Apenas um paciente com traço talassêmico beta apresentou anemia com valor de hemoglobina igual a 9,2 g/dL. A concentração média de hemoglobina entre os pacientes anêmicos com Hb A₂ normal foi 10,8 ± 0,8 g/dL e 10,8 ± 0,9 g/dL. Entre os pacientes sem anemia os valores médios de hemoglobina foram 12,2 ± 1,0 g/dL e 12,9 ± 1,1 g/dL.

Os dois pacientes com traço talassêmico beta apresentaram níveis normais de ferro com valores de 117,4 µg/mL e 115,9 µg/mL, porém um deles apresentou níveis elevados de ferritina sérica. Os valores médios de ferritina sérica entre os pacientes com Hb A₂ normal que apresentavam deficiência de ferro foram 10,5 ± 8,9 ng/mL e 13,5 ± 9,9 ng/mL. Os valores médios de ferro sérico nesses pacientes foram 70,1 ± 15,9 µg/mL e 65,1 ± 13,6 µg/mL, respectivamente. Entre os pacientes com Hb A₂ normal que não tinham deficiência de ferro os valores médios de ferro sérico foram 84,8 ± 15,9 µg/mL nos pacientes com anemia e 87,4 ± 18,9 µg/mL naqueles que não tinham anemia nem deficiência de ferro (Tabela 3).

TABELA I
Perfil eletroforético dos 86 pacientes estudados de acordo com o nível de Hb A₂

Grupos pacientes	Tipo de hemoglobina		
	A (%)	A ₂ (%)	Fetal (%)
Hb A₂ elevada			
Traço beta talassêmico (n = 2)	94,4 ± 0,1	5,0 ± 0,8	0,7 ± 0,7
Hb A₂ normal			
Com anemia e com deficiência de ferro (n = 32)	96,8 ± 0,8	2,4 ± 0,6	0,8 ± 0,5
Com anemia e sem deficiência de ferro (n = 15)	96,8 ± 0,7	2,5 ± 0,6	0,6 ± 0,4
Sem anemia e com deficiência de ferro (n = 10)	97,2 ± 0,7	2,1 ± 0,5	0,6 ± 0,3
Sem anemia e sem deficiência de ferro (n = 27)	96,8 ± 0,9	2,4 ± 0,6	0,8 ± 0,7
Grupo controle (n = 45)	97,0 ± 0,7	2,3 ± 0,7	0,8 ± 0,4

Valores de referência (de acordo com a metodologia utilizada):
Hb A: 96 a 98 %; Hb A₂: 1,0 a 3,7 %; Hb Fetal: até 2,0 %

TABELA II
Parâmetros hematológicos dos 86 pacientes estudados de acordo com o nível de Hb A₂

Grupos pacientes	Parâmetros hematológicos					
	Hto (%)	Hb (g/dL)	Hcias (x10 ¹² /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	Retic (%)
Hb A₂ elevada						
Traço beta talassêmico (n = 2)	34,8 ± 8,8	11,4 ± 3,1	4,99 ± 0,58	69,5 ± 6,5	26,1 ± 1,4	1,0 ± 0,1
Hb A₂ normal						
Com anemia e com deficiência de ferro (n = 32)	33,8 ± 2,6	10,8 ± 0,8	4,85 ± 0,45	70,4 ± 4,8	22,4 ± 1,9	1,3 ± 0,4
Com anemia e sem deficiência de ferro (n = 15)	33,3 ± 3,0	10,8 ± 0,9	4,55 ± 0,46	73,5 ± 6,6	24,0 ± 2,7	1,3 ± 0,4
Sem anemia e com deficiência de ferro (n = 10)	35,6 ± 2,5	12,2 ± 1,0	4,69 ± 0,30	75,8 ± 2,1	26,0 ± 1,7	1,2 ± 0,4
Sem anemia e sem deficiência de ferro (n = 27)	38,8 ± 3,7	12,9 ± 1,1	5,11 ± 0,60	76,1 ± 3,5	25,4 ± 2,0	1,1 ± 0,3
Grupo controle (n = 45)	39,8 ± 3,4	13,6 ± 1,0	4,55 ± 0,38	87,6 ± 4,2	30,0 ± 1,6	0,9 ± 0,2

Valores de referência: (RODAK, 2002)
 Eritrograma: Hcias: 4,60-6,00 x 10¹²/L; Hto: 40-54 %; Hb: 14,0-18,0 g/dL; VCM: 80-94 fL; HCM: 26-32 pg
 Mulheres e crianças de 8 a 13 anos: Hcias: 4,00-5,40 x 10¹²/L; Hto: 35-49 %; Hb: 12,0-15,0 g/dL; VCM: 80-94 fL; HCM: 26-32 pg
 Crianças de 3 a 7 anos: Hcias: 4,00-5,20 x 10¹²/L; Hto: 34-48 %; Hb: 10,2-15,2 g/dL; VCM: 78-94 fL; HCM: 23-31 pg
 Reticulócitos: 0,5-1,5 %

TABELA III
Parâmetros bioquímicos 86 pacientes estudados de acordo com o nível de Hb A₂

Grupos pacientes	Parâmetros bioquímicos			
	Ferritina sérica (ng/mL)	Ferro sérico (µg/mL)	CTLF (µg/dL)	Saturação transferrina (%)
Hb A₂ elevada				
Traço beta talassêmico (n = 2)	213,5 ± 160,2	116,7 ± 1,1	233,0 ± 11,3	50,2 ± 2,9
Hb A₂ normal				
Com anemia e com deficiência de ferro (n = 32)	10,5 ± 8,9	70,1 ± 15,9	418,3 ± 64,1	17,4 ± 6,0
Com anemia e sem deficiência de ferro (n = 15)	40,9 ± 41,9	84,8 ± 15,9	312,2 ± 82,9	30,3 ± 15,1
Sem anemia e com deficiência de ferro (n = 10)	13,5 ± 9,9	65,1 ± 13,6	395,8 ± 81,7	17,1 ± 5,1
Sem anemia e sem deficiência de ferro (n = 27)	70,2 ± 110,9	87,4 ± 18,9	288,7 ± 55,3	31,6 ± 10,1
Grupo controle (n = 45)	69,2 ± 22,5	95,4 ± 15,7	313,8 ± 26,0	30,7 ± 6,1

Valores de referência (de acordo com a metodologia utilizada):
 Ferritina sérica: Mulher pré-menopausa: 6 a 81 ng/mL; Mulher pós-menopausa: 14 a 198 ng/mL;
 Homem (18 a 30 anos): 30 a 233 ng/mL; Homem (31 a 60 anos): 32 a 284 ng/mL;
 Ferro sérico: 60 a 160 µg/mL; CTLF: 251 a 363 µg/dL; Saturação transferrina: 20 a 50%

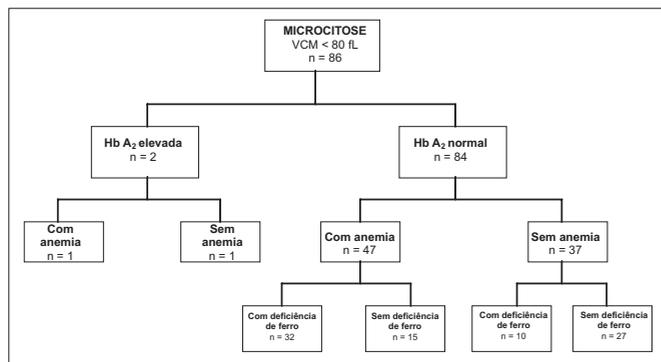


Figura 1 – Organograma de distribuição dos 86 pacientes de acordo com os critérios de classificação utilizados

DISCUSSÃO

A presença do traço talassêmico beta foi definida de acordo com os valores de referência estabelecidos a partir das determinações de Hb A₂ do grupo controle. O valor médio obtido foi 2,3 ± 0,7 % e, considerando dois desvios padrões, estabeleceu-se uma faixa de referência que variou de 0,9 % a 3,7 %. Os pacientes que apresentaram valores de Hb A₂ acima de 3,7 % foram considerados portadores do traço talassêmico beta.

A classificação quanto à presença ou não de anemia foi

feita segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde, onde os valores mínimos de hemoglobina aceitáveis são de 13,0 g/dL para homens e 12,0 g/dL para mulheres e crianças com idade entre 7 e 14 anos. Para crianças com idade compreendida entre 6 meses e 6 anos o valor mínimo aceitável é de 11,0 g/dL (OMS, 1972).

De acordo com a concentração de ferritina sérica os pacientes foram classificados como portadores ou não da deficiência de ferro.

Os portadores do traço talassêmico beta são clinicamente assintomáticos podendo apresentar discreta anemia caracterizada morfológicamente por microcitose e hipocromia com valores reduzidos de VCM e HCM. O aumento relativo dos níveis de Hb A₂ é a mais importante característica hematológica para identificação do portador do traço talassêmico beta. Esse aumento deve-se à redução de síntese de cadeias beta, com aumento de cadeias alfa livre favorecendo a formação de dímeros αδ, e posteriormente, tetrâmeros de Hb A₂ (Galanello *et al.*, 1990; Harthoorn-Lasthuizen, 1999; Thein, 2004).

Apenas um paciente com traço talassêmico beta tinha anemia e nenhum deles apresentava deficiência de ferro enquanto que entre os 84 pacientes com níveis normais de Hb A₂, 42 (50 %) apresentaram deficiência de ferro sendo que 32 pacientes (38,1 %) apresentavam também anemia, caracterizada por níveis de hemoglobina inferiores aos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para cada faixa etária.

A maioria dos indivíduos com talassemia beta portadores da mutação β⁰ ou mutação β⁺ severa, é caracterizada por uma intensa diminuição do HCM (19 a 23 pg), apresenta níveis de Hb A₂ que variam entre 4,0 e 6,0 % e Hb Fetal entre 1 e 3 %. Entretanto, alguns portadores de talassemia beta têm níveis atípicos de Hb A₂, apresentando valores entre 6,5 e 9,0% e Hb Fetal de 3 a 15%. As lesões moleculares em tais casos são grandes deleções que removem a região promotora 5' do gene da globina beta (Old, 2003). Os dois pacientes identificados nesse estudo como portadores do traço talassêmico beta apresentaram valores de Hb A₂ igual a 5,5 % e 4,4 %. O valor médio de Hb Fetal foi 0,7 ± 0,7 %. O paciente que apresentou nível mais elevado de Hb A₂ apresentou valores mais reduzidos de hemoglobina e de VCM.

Estudos realizados por diversos autores têm mostrado correlação entre a severidade dos alelos da talassemia beta e as alterações dos parâmetros hematológicos (Bertuzzo *et al.*, 1997; Garner *et al.*, 2003).

Skarmoutsou *et al.* (2003) avaliando o número de reticulócitos, as concentrações de Hb A₂ e Hb Fetal e o receptor solúvel de transferrina em 57 indivíduos com traço talassêmico beta, concluíram que todos os pacientes apresentaram eritropoese ineficaz variando de intensidade de acordo com a severidade da mutação no gene beta.

No presente estudo os valores médios de hemoglobina e hemácias nos talassêmicos foram, respectivamente, 11,4 ± 3,1 g/dL e 4,99 ± 0,58 x10¹²/L. Quando o traço talassêmico beta estava associado à anemia os valores encontrados foram 9,2 g/dL e 4,58 x10¹²/L para hemoglobina e hemácias, respectivamente. Esses dados demonstram a diversidade de alterações nos parâmetros hematológicos.

A variação na severidade dos diferentes alelos da talassemia beta é refletida nos fenótipos dos heterozigotos e no grau de hipocromia e microcitose evidenciados pelos valores da hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM), respectivamente (Garner *et al.*, 2003; Thein, 2004).

Rhund *et al.* 1991 (apud Thein, 2004) mostraram que os alelos da β^0 talassemia que estão associados a fenótipos mais severos apresentavam valores de VCM variando de 59,7 a 66,5 fL enquanto que os alelos β^+ estavam associados com valores de VCM entre 63,7 a 74,9 fL.

No presente estudo, o valor médio de VCM dos pacientes talassêmicos foi $69,5 \pm 6,5$ fL e dos 32 pacientes que apresentaram anemia ferropriva sem talassemia foi $70,4 \pm 4,8$ fL observando-se, portanto, valores mais reduzidos de VCM entre os pacientes com talassemia beta porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,999$).

Apesar do número reduzido de pacientes com traço talassêmico analisados nesse estudo, os dados obtidos mostram a necessidade de estudos moleculares posteriores que identifiquem o tipo de mutação e consequentemente as diferenças nos parâmetros hematológicos.

Trabalhos realizados por diversos autores evidenciam que as concentrações de Hb A₂ são reduzidas em alguns portadores do traço talassêmico beta que apresentam deficiência de ferro, e que esta redução está associada à severidade da anemia (Galanello *et al.*, 1990; Harthoorn-Lasthuizen *et al.*, 1999; Madan *et al.*, 1998).

De acordo com El-Agouza *et al.* (2002) a deficiência de ferro pode diminuir a transcrição ou translação do gene delta diminuindo a concentração da Hb A₂. Outra possível explicação seria a competição entre as cadeias beta da hemoglobina A e cadeias delta da Hb A₂ para a formação de outros grupos heme.

Estudos realizados por Galanello *et al.* (1990) em 587 crianças com traço talassêmico beta mostraram valores médios de Hb A₂ de $5,1 \pm 0,5$ % quando estes tinham anemia sem deficiência de ferro e de $3,9 \pm 0,8$ % quando a anemia estava associada à deficiência de ferro. Resultados semelhantes foram obtidos por El-Agouza *et al.* (2002), verificando redução estatisticamente significativa nos níveis de Hb A₂ nos pacientes talassêmicos que apresentavam associação com a deficiência de ferro.

Madan *et al.* (1998) verificaram níveis de Hb A₂ de $5,11 \pm 0,80$ % quando a anemia estava associada à deficiência de ferro e de $5,19 \pm 0,73$ % quando não havia associação da anemia com a deficiência de ferro. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Entre os não talassêmicos a menor concentração de Hb A₂ ($2,1 \pm 0,5$ %) foi observada nos pacientes sem anemia e com deficiência de ferro porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro subgrupos analisados ($p > 0,05$).

Os valores de ferritina sérica dos dois pacientes portadores de traço talassêmico beta foram 110,2 ng/mL e 326,7 ng/mL. Os níveis de ferro sérico e capacidade total de ligação do ferro estiveram normais nos dois pacientes talassêmicos analisados. O paciente que apresentou níveis elevados de ferritina sérica relatou tratamentos repetidos a base de compostos ferrosos.

Fonseca *et al.* (1995) avaliando o estado do ferro em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos encontraram 9 (25 %) pacientes com níveis de ferritina acima dos valores de referência e, 26 pacientes com ferritina normal. Quanto ao ferro sérico, CTF e saturação da transferrina os valores médios ficaram dentro dos limites de referência. Os autores concluíram que existe uma diferença significativa, com relação aos estoques de ferro, nos indivíduos talassêmicos do sexo masculino, quando comparados à população geral. Essa sobrecarga não se evidencia nos indivíduos do sexo feminino, provavelmente pelas perdas menstruais.

Analisando os dois pacientes talassêmicos pode-se obser-

var que a saturação da transferrina foi mais elevada no paciente 3 porém não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,620$).

Entre os 84 pacientes que apresentaram Hb A₂ normal, 15 pacientes tinham anemia com status de ferro normal e 27 pacientes não apresentavam anemia nem deficiência de ferro. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo mostram a necessidade de investigação molecular dos vários tipos de talassemias principalmente entre os indivíduos que apresentam microcitose e hipocromia possibilitando a diferenciação com a anemia por deficiência de ferro e, consequentemente, um tratamento adequado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – Setor de Hemoglobinopatias pela realização das dosagens de Hb A₂ por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

REFERÊNCIAS

1. Betke, K.; Marti, H.R.; Schlicht, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, 184:1877-1878, 1959.
2. Bezerra, T.M.M. Quantificação de hemoglobina A₂ por eletroforese em acetato de celulose. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 20(5):143-145, 1984.
3. Bertuzzo, C.S.; Sonati, M.F.; Costa, F.F. Hematological phenotype and the type of β thalassemia mutation in Brazil. *Braz. J. Genet.*, 20(2):1-5, 1997.
4. Cao, A.; Saba, L.; Galanello, R.; Rosatelli, M. C. Molecular diagnosis and carrier screening for β thalassemia. *J. Am. Med. Assoc.*, 278(15):1273-1277, 1997.
5. Dacie, J.V.; Lewis, S.M. *Practical Haematology*. 8 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
6. El-Agouza, I.; Abu Shahla, A.; Sirdah, M. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin. Lab. Haematol.*, 24:285-289, 2002.
7. Fonseca, S.F.; Kimura, E.Y.S.; Kerbauy, J. Avaliação do estado do ferro em indivíduos beta-talassêmicos heterozigotos. *Rev. Ass. Med. Bras.*, 41(3):203-206, 1995.
8. Galanello, R.; Turco, M.P.; Barella, S.; Giacu, N.; Dessi, C.; Cornacchia, G. *et al.* Iron stores and iron deficiency anemia in children heterozygous for β -thalassemia. *Hematologica*, 75:319-322, 1990.
9. Galanello, R.; Cao, A. Relationship between genotype and phenotype. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 850:325-333, 1998.
10. Garner, C.; Dew, T.K.; Sherwood, R.; Rees, D.; Thein, S.L. Heterocellular hereditary persistence of fetal haemoglobin affects the haematological parameters of β -thalassemia trait. *Br. J. Haematol.*, 123(2):253-258, 2003.
11. Harthoorn-Lasthuizen, E.J.; Lindemans, J.; Langenhuijsen, M.M.A.C. Influence of iron deficiency anaemia on haemoglobin A₂ levels: possible consequences for β -thalassaemia screening. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 59:65-70, 1999.
12. Madan, N.; Sikka, M.; Sharma, S.; Rusia, U. Haematological parameters and Hb A₂ levels in beta-thalassaemia trait with coincident iron deficiency. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 41(3):309-313, 1998.
13. Old, J.M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews*, 17:43-53, 2003.
14. OMS. Organización Mundial de la Salud. Anemias nutricionales. Ginebra, 1972 (Série de informes técnicos, n° 503).
15. Shine, J. W. Microcytic Anemia. *Am. Fam. Physician*, 55(7):2455-2462, 1997.
16. Skarmotsou, C.; Papassotiriou, I.; Traeger-Synodinos, J.; Stamou, H.; Ladis, V.; Metaxotou-Mavrommati, A. *et al.* Erythroid bone marrow activity and red cell hemoglobinization in iron sufficient beta-thalassemia heterozygotes as reflected by soluble transferrin receptor and reticulocyte hemoglobin in con-

- tent. Correlation with genotypes and Hb A2 levels. Haematologica, 88:631-636, 2003.
17. Sonati, M.F.; Grotto, H.Z.W.; Kimura, E.M.; Costa, F.F. Diferenciação entre talassemia beta-herozigótica e anemia ferropriva. Rev. Ass. Med. Bras., 39(4):221-223, 1993.
18. Thein, S.L. Genetics insights into the clinical diversity of , thalassaemia. Br. J. Haematol., 124:264-274, 2004.
19. Van Zeben, D.; Bieger, R.; Van Werneskerken, R.K.A.; Castel, A.; Hermans, J. Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. Eur. J. Haematol., 44:105-108, 1990.
20. Weatherall, D.J.; Clegg, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. Semin. Hematol., 36(suppl. 7):24-37, 1999.
21. Weatherall, D.J.; Clegg, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull. World Health Org., 79(8):704-712, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Rua Gal. Cordeiro de Farias s/n – 1º andar
CEP 59010-180 Natal RN
Fone: (84)3215-4231/3215-4226
e-mail: tdantas@ufrnet.br

Credibilidade e Confiança.

PNCQ

33 anos contribuindo para o desenvolvimento dos laboratórios clínicos de todo o Brasil.

Diagnosticos precisos para os médicos

Credibilidade para seu laboratório

Confiança para a sociedade

Participe!

www.pncq.org.br
pncq@pncq.org.br
(21)2569-6867



**Programa
Nacional de
Controle de
Qualidade**

PNCQ

PRÊMIO DOLES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio da DOLES REAGENTES;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 3.000,00 (três mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica tem por objetivos;
- 11) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Bioquímica Clínica no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho de bioquímica clínica inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 11) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Doles de Bioquímica Clínica poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Doles de Bioquímica Clínica, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 11) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Doles, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Doles de Bioquímica Clínica
Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Pesquisa de anticorpos anti-endomísio no laboratório de imunopatologia da ufpr: dez anos de experiência na triagem de doença celíaca em pacientes, grupos de risco e populações*

Antiendomysium antibodies evaluation in the laboratory of immunopathology of the ufpr: ten years of experience in the screening of celiac disease in patients, groups at risk and in the general population

Shirley Ramos da Rosa Utiyama¹, Lorete Maria da Silva Kotze², Renato Mitsunori Nisihara¹, Isabela Goeldner da Silva¹, Flávia Raphaela Nass¹, Ricardo de Bem, Thelma Skare, Márcia L. Baptista, Iara Tabora de Messias-Reason¹

RESUMO - O Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, através da pesquisa do anticorpo anti-endomísio (EmA-IgA), tem contribuído ao longo dos últimos dez anos com a triagem e diagnóstico diferencial da doença celíaca (DC) em pacientes, grupos de risco e populações do sul do Brasil. No presente estudo, tem-se uma síntese das investigações mais relevantes que foram realizadas e que possibilitaram demonstrar a alta especificidade e sensibilidade desse teste, seu valor no diagnóstico da doença e no monitoramento da dieta isenta de glúten, assim como sua correlação com os anticorpos anti-transglutaminase e o grau de lesão na mucosa intestinal. O EmA-IgA tem sido avaliado por imunofluorescência indireta, utilizando cordão umbilical humano como substrato, e conjugado fluorescente anti-IgA. O compilamento de dados dos estudos com familiares de celíacos (n=200), pacientes com síndrome de Down (n=150), *diabetes mellitus* (n=104), cardiomiopatias (n=74), artrite reumatóide (n=85), doadores de banco de sangue (n=2000) e indivíduos da população sadia (n=180), permitiu demonstrar significativa diferença na frequência do EmA-IgA no grupo de familiares (p<0.001), pacientes com síndrome de Down (p=0.0024) e *diabetes mellitus* (p<0.001), em relação à população sadia. Os dados obtidos nos últimos dez anos de pesquisa nessa área indicam os familiares de celíacos como o grupo de maior risco ao desenvolvimento da doença, e ressaltam a importância de *screenings* periódicos para DC em pacientes com doenças autoimunes e /ou outras afecções.

PALAVRAS-CHAVE - Doença celíaca, anticorpo anti-endomísio, familiares de celíacos, síndrome de Down, *diabetes mellitus*, artrite reumatóide, cardiomiopatias.

SUMMARY - The Laboratory of Immunopathology, from Clinical Hospital of the Federal University of Paraná, through the evaluation of antiendomysium antibody (IgA-EmA), has contributed along the last ten years with the screening and differential diagnosis of celiac disease (CD) in patients, groups at risk and populations from southern Brazil. Here we present a summary of the most relevant studies developed in the laboratory, which demonstrated the high specificity and sensibility of this test, its relevance in diagnosis of CD and in the monitoring of a gluten free diet, as well as its correlation with anti-tissue transglutaminase antibody and with the lesion degree in the intestinal mucosal. The IgA-EmA has been evaluated by indirect immunofluorescence using human umbilical cord as substrate, and anti-IgA fluorescent conjugate. Data compilation of studies with relatives of CD patients (n=200), Dow's syndrome patients (n=150), *diabetes mellitus* (n=104), cardiomyopathy (n=74), rheumatoid arthritis (n=85), blood donors (n=2000) and healthy population (n=180), allowed to demonstrate significant differences in the frequency of IgA-EmA in relatives (p<0.001), Dow's syndrome patients (p=0.0024) and *diabetes mellitus* groups (p<0.001), in relation to the healthy population. The compiled data of the last ten years of research in this subject indicate that the relatives of celiac patients are the group at higher risk to develop CD and emphasize the importance of periodic screenings for CD in patients with autoimmune diseases and/or others affections.

KEYWORDS - Celiac disease, antiendomysium antibodies, relatives, Down syndrome, *diabetes mellitus*, rheumatoid arthritis, cardiomyopathy.

INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é caracterizada por uma reação inflamatória crônica no intestino em resposta à ingestão de glúten presente na dieta. É uma doença multifatorial, resultante da combinação entre suscetibilidade genética, exposição ambiental e resposta imune, o que leva à inflamação intestinal, perda das vilosidades intestinais e conseqüente má absorção de nutrientes (18, 35). A forma clássica da doença apresenta sintomas gastrointestinais tais como distensão abdominal e diarreia crônica; porém, formas atípicas são freqüentes e variam desde sintomas extra-intestinais até formas assintomáticas (47).

A DC afeta principalmente indivíduos com descendência européia e tem seu desenvolvimento fortemente influenciado pela genética. No Brasil, as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores prevalências, tanto por sua marcada colonização européia, como pela maior disponibilidade de exames diagnósticos.

Devido à grande variabilidade de apresentações clínicas, o diagnóstico da DC é muitas vezes difícil, demorado ou mesmo não viabilizado. Apesar de a biópsia intestinal ser ainda o gold standard no diagnóstico da DC, a ampla utilização de testes sorológicos na prática clínica é fundamental na identificação dos pacientes que necessitam da bióp-

Recebido em 26/12/2007
Aprovado em 16/01/2009

* Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas, UFPR

¹Laboratório de Imunopatologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná,

²Serviço de Gastroenterologia, Hospital Universitário Cajuru, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR.

sia para o diagnóstico da patologia, na triagem de grupos de risco e na monitorização da resposta ao tratamento. A determinação do anticorpo anti-endomísio (EmA-IgA) representa atualmente o melhor teste de triagem para DC (1, 5, 25, 31, 32, 39, 51).

O Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná, inaugurado em 1986, completou, no ano de 2007, dez anos de experiência com ensaios sorológicos para diagnóstico da DC. Dois anos após, Volta et al. (1995) descreveram o uso de cordão umbilical humano como substrato para pesquisa do EmA-IgA, por imunofluorescência indireta, o Laboratório já se encontrava com a técnica padronizada, empregando-a tanto na rotina dos pacientes como em estudos de investigação. Embora a necessidade da implantação de um método sorológico de triagem para o diagnóstico da afecção fosse uma realidade de longa data para os doentes do HC, o emprego de esfago de macaco como substrato da reação representava uma limitação tanto no aspecto ético como no financeiro.

Através da pesquisa do EmA-IgA foi possível contribuir, ao longo desses dez anos, de forma não invasiva, com a triagem e diagnóstico diferencial de pacientes suspeitos de apresentarem DC, encaminhados pelos diversos serviços do HC. No contexto de uma visão científica, e buscando contribuir com serviços de outras instituições, as investigações realizadas foram gradualmente organizadas e relatadas em congressos e periódicos científicos nacionais e internacionais.

Os dados mais preliminares, buscando demonstrar a alta especificidade e sensibilidade do método, e seu valor no diagnóstico da doença e no monitoramento da dieta isenta de glúten, começaram a ser relatados no ano de 2001 (31), embora a comparação do EmA-IgA em pacientes celíacos, com o anticorpo anti-reticulina, ressaltando a superioridade do anticorpo anti-endomísio nos aspectos recém citados já tivessem sido demonstrados desde 1999 (29). Aliado aos estudos com os pacientes, precocemente tiveram início as triagens sorológicas em familiares de celíacos, que vieram a constituir uma importante linha de pesquisa no Laboratório. Gradualmente demonstrou-se a alta prevalência da doença nesse grupo de indivíduos, com dados similares aos relatos mundiais, possivelmente relacionadas à própria miscigenação da população brasileira (31, 51, 54). Com a descoberta da transglutaminase tecidual como antígeno alvo do processo autoimune na DC (15), e a consequente padronização de kits de ELISA para pesquisa do anticorpo anti-transglutaminase (anti-tTG-IgA), estudos visando comparar esse anticorpo com o EmA-IgA em pacientes celíacos também foram realizados (52) além de análises avaliando a correlação entre os métodos sorológicos e o grau de lesão da mucosa intestinal (32). Mais recentemente, analisou-se ainda o grau de confiabilidade do EmA-IgA e do anti-tTG-IgA como métodos de triagem em familiares de celíacos (55).

Diante de relatos salientando a importante associação da DC com outras doenças autoimunes, um amplo perfil de auto-anticorpos foi realizado em amostras de soros de pacientes celíacos e familiares (51). Decorrente dessa triagem, um estudo clínico e laboratorial minucioso relacionado às doenças tireoideanas foi desenvolvido em pacientes celíacos do sul do Brasil (35).

Visando avaliar o envolvimento de componentes da imunidade inata na resposta imune de pacientes com DC, foram executados projetos de pesquisa nos quais foi pos-

sível determinar tanto a variabilidade genética do fator B (BF) da via alternativa do sistema complemento (54), como as concentrações séricas da proteína ligante de manose (MBL) em amostras de soros dos pacientes celíacos e familiares (8). Os dados obtidos foram associados a aspectos clínicos, histológicos, demográficos e à ocorrência de outras doenças autoimunes nos pacientes.

A experiência gradualmente adquirida possibilitou que alguns artigos de revisão fossem publicados (49, 53), bem como uma síntese da longa experiência no atendimento à pacientes celíacos do sexo feminino, voltado aos aspectos nutricionais e ginecológicos (33).

Cabe ainda ressaltar que estudos com pacientes com síndrome de Down (39), diabetes mellitus (4), cardiomiopatias (14) e artrite reumatóide (40), assim como com familiares de celíacos (55), doadores de banco de sangue e indivíduos voluntários sadios da população, foram realizados ao longo desses 10 anos. Alguns aspectos peculiares sobre cada um desses grupos, conforme citado a seguir, motivaram os projetos de investigação.

Dentre os grupos de maior risco para DC destacam-se os familiares de pacientes celíacos, freqüentemente com maior prevalência da doença. O screening periódico nesses indivíduos permite o diagnóstico precoce da DC e a instituição da dieta isenta de glúten, prevenindo dessa forma as complicações decorrentes da doença não tratada (1, 24, 35, 55, 51, 56).

O diabetes mellitus tipo 1 tem sido relatado em pacientes com DC. A associação entre essas duas doenças pode ser parcialmente explicada pelo compartilhamento de genes HLA que ocorre entre a DC e o diabetes mellitus tipo 1 (3, 41, 42, 58). As formas silenciosas e atípicas da DC são as mais freqüentemente encontradas em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1. Dessa forma, vários autores recomendam a realização de screenings para DC e *diabetes mellitus* tipo 1 tanto nos pacientes celíacos como nos pacientes diabéticos tipo 1, com o objetivo de diagnosticar a doença não tratada e implantar o tratamento, melhorando dessa forma a qualidade de vida do paciente (4, 26).

A associação entre DC e a síndrome de Down (SD) já se encontra bem estabelecida. Pacientes com SD apresentam grande variedade de alterações digestivas e distúrbios imunológicos relacionados ao trato gastrointestinal. A causa dessa associação parece estar relacionada com a influência de respostas imunes sobre genes do cromossomo 21. Essa função anormal de genes localizados no cromossomo 21 é causa de disfunções imunes gerais, incluindo baixa imunidade local e alta susceptibilidade a infecções. Pode ainda contribuir para a alteração na integridade intestinal, o que facilita a entrada de antígenos alimentares através da mucosa intestinal. Entretanto, acredita-se que genes diretamente ligados à manutenção da integridade da mucosa intestinal possam também estar envolvidos (38, 49).

A cardiomiopatia associada à DC é uma condição séria e potencialmente letal. Dentre as cardiomiopatias mais freqüentemente descritas em pacientes com DC estão a cardiomiopatia dilatada e a miocardite auto-imune. Alguns autores supõem que a má absorção crônica de micronutrientes causada pela DC, como a carnitina, possa estar relacionada ao baixo desempenho cardíaco e ao desenvolvimento de cardiomiopatias (13, 45). Estudos relatam melhora no desempenho cardíaco de pacientes celíacos que apresentavam cardiomiopatia dilatada idiopática e miocardite, após a adoção da dieta isenta de glúten (12, 20).

Já a associação entre DC e artrite reumatóide é ainda controversa. Enquanto alguns autores encontram prevalências

elevadas da DC em pacientes com artrite reumatóide, outros obtêm resultados completamente negativos (28, 48). Doadores de sangue também tem sido alvo de inúmeros estudos, visando estimar a prevalência da DC na população em geral. No Brasil, tem-se até o momento estudos em doadores de sangue de Brasília, Ribeirão Preto, São Paulo e Curitiba, mostrando uma variação na prevalência entre 1:681 a 1:214, os quais sugerem que a DC não deve ser considerada uma condição rara no país (22, 37, 44). A elevada morbidade da DC quando associada a alguma outra condição ou quando não diagnosticada, assim como a necessidade de se estabelecer uma prevalência que contemple as características da população do sul do Brasil, justificam os diversos estudos realizados. Nesse contexto, além de citar-se os estudos já realizados nos pacientes com DC, considera-se de relevante valor compilar os dados obtidos em relatos prévios com os diferentes grupos de pacientes e populações citados, visando tanto divulgar a experiência que foi alcançada ao avaliar o conjunto dos resultados no decorrer desses anos, como salientar para outros serviços que trabalham com sorologia para DC a importância da triagem dessa afecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Foram compilados os dados de alguns grupos de pacientes e indivíduos da população avaliados para a presença dos anticorpos anti-endomísio no Laboratório de Imunopatologia, no decorrer dos anos de 1997 a 2007. Foram estes: pacientes com síndrome de Down, diabetes mellitus tipo I, artrite reumatóide e cardiomiopatia, bem como familiares de pacientes com DC, doadores de Banco de Sangue, além de um grupo composto por indivíduos sadios da população. Tem-se na tabela 1 os dados demográficos das populações em estudo. Todos os estudos tiveram prévia aprovação pelo Comitê de Ética.

METODOLOGIA

Pesquisa de Anticorpos Anti-Endomísio (EmA-IgA):

A investigação de anticorpos anti-endomísio nas amostras em estudo foi realizada por técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), conforme descrito por VOLTA et al., em 1995 (57). Esta utiliza como substrato cortes criostáticos de cordão umbilical humano.

O cordão umbilical foi obtido, após consentimento informado, de gestantes sadias, no momento do parto no Centro Obstétrico do HC, UFPR. Após a excisão do cordão, um pequeno fragmento do mesmo é mergulhado em solução salina 0,9%, seccionado transversalmente em pequenos blocos e mergulhado em OCT-Tissue Tek (Miles, USA). Os blocos são congelados em nitrogênio líquido e preservados à temperatura de -80°C.

Cortes criostáticos de 3µm de espessura são colocados sobre lâminas de vidro previamente fixadas com Gelatina 0,5% e Azida Sódica, sendo mantidas à temperatura de -20°C até o momento de uso nas reações de Imunofluorescência Indireta. Os soros teste são submetidos a uma diluição inicial de triagem, na proporção de 1:2,5, utilizando tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. Esses, juntamente com soros controle, são colocados nas lâminas contendo o substrato, para posterior incubação em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após lavar as lâminas em PBS três vezes, (5 minutos cada vez), procede-se nova incubação com

o conjugado fluorescente anti-IgA (INOVA), para posterior lavagem das lâminas e montagem com glicerina tamponada. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus, por dois profissionais, de forma independente, sendo consideradas positivas as amostras que caracterizaram fluorescência a partir da diluição de 1:2,5. Após a triagem, os exames positivos na diluição de 1:2,5 são retetados para definição do título final de anticorpos.

Na reação positiva para o EmA-IgA, cora-se a substância intermiofibrilar no tecido de endomísio, cuja localização se dá no contorno das fibras de músculo liso na parede dos vasos e artérias do cordão umbilical.

Estatística: A análise estatística foi realizada com o software STATISTICA, aplicando-se o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi menor que 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

O compilamento dos resultados obtidos nos estudos prévios citados está demonstrado na figura 1 e tabela 2. O grupo composto por 180 indivíduos voluntários e sadios, moradores da mesma área geográfica dos pacientes avaliados, com faixa etária variando entre 02-81 anos, foi totalmente negativo para o EmA-IgA (0%; 0/180). A análise sorológica dos familiares de pacientes celíacos ($n=200$) revelou uma positividade de 12% (24/200) para o EmA-IgA, caracterizando uma significativa diferença em relação ao grupo de indivíduos sadios (0%; $p < 0,001$). Dos 24 familiares positivos, 54,17% (13/24) eram do sexo feminino e 45,83% (11/24) do sexo masculino.

Dentre as amostras dos pacientes com *diabetes mellitus* tipo I, 8,7% (9/104) apresentaram resultados positivos para o EmA-IgA, com títulos variando entre 1:2,5 a 1:40. Todos os pacientes positivos foram submetidos à biópsia intestinal para confirmação do diagnóstico. Em quatro desses a biópsia revelou normalidade da mucosa intestinal; em dois pacientes verificou-se atrofia subtotal e em três atrofia parcial. Cinco desses pacientes (55,6%) eram do sexo feminino e 4 (44,4%) do masculino. A positividade para o EmA-IgA nos pacientes diabéticos (8,7%) foi significativamente elevada em relação aos indivíduos sadios da população (0%; $p < 0,001$).

Dos 150 pacientes com síndrome de Down (SD) avaliados, 3,3% (5/150) tiveram resultados positivos para o EmA-IgA, com títulos variando entre 1:2,5 a 1:80. Dos cinco pacientes cujo EmA-IgA foi positivo, todos do sexo masculino, quatro foram submetidos à biópsia intestinal, sendo que três apresentaram atrofia total da mucosa e um atrofia parcial, confirmando o diagnóstico de DC em todos. A análise desse grupo, em relação aos indivíduos sadios (0%), caracterizou diferença significativa na frequência do EmA-IgA entre ambos ($p=0,019$).

A análise sorológica dos 74 pacientes com cardiomiopatia mostrou positividade de 2,7% (2/74) para o EmA-IgA, com títulos iguais a 1:2,5 nas duas amostras. Ambos os pacientes, um do sexo masculino e outro feminino, foram submetidos à biópsia intestinal, que revelou em um deles atrofia total da mucosa intestinal e, no outro, atrofia parcial da mucosa. A análise desse grupo não mostrou diferença significativa em relação aos indivíduos sadios da população ($p=0,084$).

Dentre 2000 amostras de doadores de banco de sangue, 0,1% mostrou positividade para o EmA-IgA (2/2000), com títulos de 1:10 e 1:80. Não foi possível a realização da análise da biópsia intestinal nesses indivíduos, ficando comprometida a confirmação do diagnóstico nos mesmos. Similar aos indivíduos da população sadia, nenhum dos 85 pacientes com artrite reumatóide que participaram do

TABELA I
Dados demográficos das populações em estudo

GRUPOS	N	SEXO		IDADE MÉDIA (FAIXA ETÁRIA)	MEDIANA
		♂	♀		
FAMILIARES	200	83	117	33,78 (02-83)	34
DIABETES MELLITUS	104	52	52	10 (02-19)	8
SÍNDROME DE DOWN	150	93	57	5,77 (02-18)	4
CARDIOMIOPATIA	74	51	23	47,3 (19-72)	49
ARTRITE REUMATÓIDE	85	11	74	47 (23-71)	47
DOADORES DE SANGUE	2000	1374	626	36 (18-59)	35
POPULAÇÃO SADIA	180	62	118	25 (02-81)	19

NOTA: ♂= sexo masculino; ♀ = sexo feminino

TABELA II
Ema-iga e biópsia intestinal nos grupos em estudo

GRUPOS	N	EmA-IgA				TÍTULOS	BIÓPSIA INTESTINAL
		POSITIVIDADE (%)	SEXO				
			♂	♀			
FAMILIARES	200	12% (24/200)	45,83% (11/24)	54,17% (13/24)	1:2,5 - 1:80	Em andamento	
DIABETES MELLITUS	104	8,7% (9/104)	55,6% (5/9)	44,4% (4/9)	1:2,5-1:40	4 N; 2ASTV; 3 APV	
SÍNDROME DE DOWN	150	3,3% (5/150)	100% (5/5)	0% (0/5)	1:2,5-1:80	3 ATV; 1 APV	
CARDIOMIOPATIA	74	2,7% (2/74)	50% (1/2)	50% (1/2)	1:2,5	1 ATV; 1 APV	
ARTRITE REUMATÓIDE	85	0% (0/85)	—	—	—	—	
DOADORES DE SANGUE	2000	0,1% (2/2000)	50% (1/2)	50% (1/2)	1:10 - 1:80	ND	
POPULAÇÃO SADIA	180	0% (0/180)	—	—	—	—	

NOTAS: ♂= sexo masculino; ♀ = sexo feminino

Biópsia intestinal: N= normal; APV= atrofia parcial de vilosidades; ASTV=atrofia subtotal de vilosidades; ATV= atrofia total de vilosidades; ND= não determinada

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos não invasivos tem permitido que inúmeros estudos sejam realizados com o objetivo de avaliar a prevalência da DC em diversas populações. A viabilização desses métodos veio favorecer o diagnóstico precoce da doença, reduzindo assim a morbidade da DC não tratada (2).

A análise sorológica realizada nos familiares de pacientes celíacos do presente estudo, caracterizando 12% de positividade para o EmA-IgA, sugere elevada prevalência da DC nesses indivíduos em relação aos demais grupos avaliados. Até o momento, dentre os 24 familiares positivos, a biópsia intestinal já permitiu a confirmação do diagnóstico de DC em 11 desses. Tais dados estão em concordância com aqueles obtidos por inúmeros autores (9, 56, 57), estando a positividade para EmA-IgA em nosso estudo muito próxima à de 10,9% descrita recentemente por BONAMICO *et al.* (2006). Por sua vez, um amplo estudo realizado por FASANO *et al.* (2003), mostrou uma prevalência para a DC em familiares de pacientes celíacos de 4,5%, sendo que tanto o EmA-IgA quanto a biópsia intestinal foram utilizados como critérios diagnósticos. Tais dados mostram a diversidade de resultados nas diferentes populações.

Os resultados obtidos para o EmA-IgA reforçam o valor dos testes sorológicos como triagem, visando o encaminhamento desses indivíduos para confirmação do diagnóstico, considerando que a DC apresenta-se frequentemente na forma silenciosa, mesmo dentre os familiares de celíacos. Por sua vez, estudos recentes mostram uma prevalência de

DC em pacientes com SD variando entre 3,2% e 10,3% (6, 10). No grupo de pacientes com SD avaliados no Laboratório de Imunopatologia, 3,3% caracterizaram positividade para o EmA-IgA, resultado esse que vai ao encontro da literatura. Em apenas um paciente com SD não foi possível a realização da biópsia intestinal, sendo que os demais tiveram comprovado o diagnóstico da doença (39). Mesmo diante de resultados sorológicos negativos, pacientes com SD devem ser submetidos a testes sorológicos periodicamente, considerando que se trata de um grupo de risco para a doença, como mostra a significativa diferença detectada nos mesmos em relação ao grupo de indivíduos sadios avaliados no presente estudo (0%; $p=0,019$). Deve-se considerar ainda que a evolução sorológica dos anticorpos pode levar indivíduos previamente negativos à positividade (11).

Os pacientes com diabetes mellitus tipo 1 mostraram alta prevalência do EmA-IgA em relação ao grupo de indivíduos da população sadia (8,7% x 0%; $p= <0,001$). Todos os pacientes positivos para o EmA-IgA foram submetidos à biópsia intestinal, sendo na totalidade dos casos confirmado o diagnóstico de DC (4). Já é bem estabelecido que a DC e o diabetes mellitus tipo 1 são doenças auto-imunes associadas à presença de alelos HLA específicos (3, 27). O compartilhamento de genes HLA entre DC e diabetes mellitus tipo 1 possivelmente representa a causa mais provável da freqüente associação dessas duas doenças.

O risco elevado encontrado para os pacientes diabéticos tipo 1 é consistente com achados anteriores e justifica a realização de screenings periódicos nessa população (4, 21, 26, 36). Corroborando, comparativamente, o grupo de diabéticos avaliado no laboratório de Imunopatologia mostra freqüência superior do EmA-IgA (8,7%) em relação aos pacientes com artrite reumatóide (0%), Síndrome de Down (3,3%) e cardiomiopatias (2,7%).

Diversos estudos relatam a associação entre DC não tratada e cardiomiopatias, como a miocardite e a cardiomiopatia dilatada (12, 14, 20, 23, 43). De acordo com CURIONE *et al.* (2005), a prevalência de DC detectada em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática foi de 5,7%, diferindo significativamente do restante da população. No estudo realizado na população de pacientes da nossa região, 2,7% (2/74) daqueles com cardiopatia apresentaram EmA-IgA positivo, sendo que ambos foram submetidos à biópsia que revelou atrofia total e parcial da mucosa intestinal, confirmando o diagnóstico de DC nos dois pacientes (14). Chama a atenção os baixos títulos de EmA-IgA em ambos (1:2,5), e a gravidade da lesão detectada na mucosa intestinal, vindo ao encontro de relatos prévios que evidenciam tais situações e salientam a importância de confirmar o diagnóstico histologicamente (32). A baixa prevalência encontrada no presente estudo é também relatada na literatura, que sugere estar relacionada a um grande número de casos de DC não diagnosticados, com sintomas despercebidos ou não valorizados (14, 19). Nossos dados, em conjunto com os demais relatos existentes, sustentam a recomendação de realizar-se investigação de DC em pacientes com cardiomiopatias, a fim de diagnosticar e tratar adequadamente esses pacientes, embora não se tenha evidenciado diferença significativa da população sadia (0%; $p= 0,084$). Cabe ao clínico estar atento aos sintomas que possam sugerir a doença nos mesmos e investigar.

Embora todos os pacientes com artrite reumatóide avaliados nos estudos do Laboratório de Imunopatologia tenham sido negativos para o EmA-IgA (40), é importante estar atento para os dados clínicos dos indivíduos. Diarréia

crônica, perda de peso e distensão abdominal são sintomas sugestivos de DC e requerem que o clínico proceda a uma investigação mais apurada, através de testes sorológicos e biópsia intestinal. Além disso, deve-se considerar que a presença de uma doença autoimune prévia pode, muitas vezes, predispor o paciente a desenvolver outra doença. Os estudos sorológicos realizados em doadores de banco de sangue visam à determinação da prevalência de uma dada doença em populações. Na presente investigação, com doadores de sangue do HC-UFPR, embora não tenha sido possível a confirmação do diagnóstico da doença por biópsia intestinal, 0,1% desses apresentaram EmA-IgA positivo, o que seria sugestivo de uma baixa prevalência da DC na população do sul do Brasil (1:1000). No entanto, características freqüentes em doadores de sangue, como sexo masculino e peso geralmente acima de 60kg, podem ter influenciado tais resultados, aliado ao fato de não se ter indivíduos com anemia, crianças e gestantes como doadores. É sabido que a DC apresenta prevalência discretamente aumentada no sexo feminino, além disso, pacientes celíacos com freqüência apresentam baixo peso corpóreo (16,25). GANDOLFI *et al.* (2000) estimam a prevalência da DC no Brasil em 0,14%. Relatos recentes demonstraram prevalência na população do sul do país de 1:417 (46), mostrando-se superior aos dados observados em nosso estudo, o que é pertinente com as características étnicas de uma população altamente miscigenada. Estudos mais abrangentes e com maior número de indivíduos possivelmente esclarecerão a real prevalência dessa região. Dessa forma, os familiares de pacientes com DC foi o grupo que apresentou na triagem sorológica maior prevalência para os anticorpos EmA-IgA (Fig. 1), em relação a todos os grupos avaliados, com diferença significativa na comparação com a população sadia ($p < 0,001$). Tais dados reforçam estudos prévios enfatizando a forte associação genética da doença e a importância da triagem e seguimento desses indivíduos.

Concomitantemente, amostras de familiares de celíacos (55), pacientes com SD (39) e pacientes com cardiomiopatias (14) foram também avaliadas para o anticorpo anti-tTG-IgA, sendo que o desempenho e a comparação entre as metodologias foi descrita especificamente em cada um dos relatos citados.

A distribuição da positividade entre os sexos observada para o EmA-IgA nos grupos avaliados no presente levantamento (Tabela 2) é concordante com dados da literatura, em que se tem relatos mostrando um predomínio da DC em mulheres na proporção aproximada de 2,9:1 (24). Em todos os grupos estudados, a positividade para o EmA-IgA entre homens e mulheres manteve-se muito próxima, com discreta elevação nas mulheres, em algumas situações. Para os familiares de pacientes celíacos, a positividade para homens e mulheres foi de 45,83% e 54,17%, respectivamente. Nos pacientes diabéticos foi de 44,4% para homens e 55,6% para mulheres, enquanto nos pacientes com cardiopatias a positividade foi de exatamente 50% para cada sexo, similar à observada no grupo de doadores de banco de sangue. Os pacientes com SD eram predominantemente do sexo masculino, o que talvez explique a positividade de 100% para o EmA-IgA observada nesses indivíduos. Nossos dados reforçam a paridade da DC entre os sexos, com discreto predomínio no sexo feminino em alguns grupos, o que difere marcadamente de outras doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico e doenças auto-imunes da tireóide.

O presente relato retrata a experiência de 10 anos de sorologia para o EmA-IgA em DC realizada no Laboratório

de Imunopatologia do HC, UFPR, e salienta o valor de screenings sorológicos em populações consideradas de risco para a DC e sua aplicabilidade na identificação de casos não diagnosticados e na prevenção das malignidades da DC não tratada. É inquestionável a afirmação de que os familiares de celíacos representam o grupo de maior risco ao desenvolvimento da doença. No entanto, os dados ressaltam a importância da investigação em outros grupos de pacientes com doenças autoimunes e/ou outras afecções, bem como grupos populacionais. Enfatiza-se a importância do encaminhamento para biópsia intestinal e confirmação do diagnóstico, mesmo diante de baixos títulos de EmA-IgA.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos através dos estudos realizados no Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da UFPR demonstram a importância de realizar-se screenings periódicos nos grupos considerados de risco para o desenvolvimento da DC. Visa-se não apenas o diagnóstico de formas atípicas ou silenciosas da doença e a implantação precoce da dieta isenta de glúten, mas, acima de tudo, a contribuição para uma maior qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Alaedini A; Green PHR. Narrative Review: Celiac Disease: Understanding a Complex Autoimmune Disorder. *Ann Intern Med.*, 142:289-299, 2005.
2. Bai J; Zeballos E; Fried M; Corazza GR; Schuppan D; Farthing MJG; Catassi C; Greco L; Cohen H; Krabshuis JH. Celiac Disease. *WGN*, 10:1-8, 2005.
3. Bao F; Yu L; Babu S; Wang T; Hoffenberg EJ; Rewers M; Eisenbarth GS. One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease associated transglutaminase autoantibodies. *J Autoimmun.*, 13:143-148, 1999.
4. Baptista ML; Koda YK; Mitsunori R; Nishihara RM; Ioshii SO. Prevalence of celiac disease in Brazilian children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 41:621-624, 2005.
5. Bardella MT; Trovato C; Cesana BM; Pagliari C; Gebbia C; Peracchi M. Serological markers for coeliac disease: is it time to change? *Dig Liver Dis.*, 33:426-431, 2001.
6. Bonamico M; Mariani P; Danesi HM; Crisogianni M; Failla P; Gemme G; Quartino AR; Giannotti A; Castro M; Balli F; Lecora M; Andria G; Guariso G; Gabrielli O; Catassi C; Lazzari R; Balocco NA; De Virgili S; Culasso F; Romano C; SIGEP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology) and Medical Genetic Group. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 33:139-143, 2001.
7. Bonamico M; Ferri M; Mariani P; Nenna R; Thanasi E; Luparia RP; Picarelli A; Magliocca FM; Mora B; Bardella MT; Verrienti A; Fiore B; Uccini S; Megiorni F; Mazzilli MC; Tiberti C. Serologic and genetic markers of Celiac Disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 42:150-154, 2006.
8. Carvalho EG; Utiyama SRR; Kotze LMS; Messias Reason IT. Serum mannan-binding lectin levels in patients with celiac disease: an analysis of clinical and autoimmune features. *Dig Dis Sci.*, 52(9):2145-51, 2007.
9. Cataldo F; Marino V. Increased Prevalence of Autoimmune Diseases in First-Degree Relatives of Patients With Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 36:470-473, 2003.
10. Cogulu O; Ozkinay F; Gunduz C; Cankaya T; Aydogdu S; Ozgenc F; Kutukculer N; Ozkinay C. Celiac disease in children with Down syndrome: importance of follow-up and serologic screening. *Pediatr Int.*, 45:395-399, 2003.
11. Cszizmadia CG; Mearin ML; Oren A; Kromhout A; Crusius JB; von Blomberg BM; Peña AS; Wiggers MN; Vandenbroucke JP. Accuracy and cost-effectiveness of a new strategy to screen for celiac disease in children with Down

- syndrome. *J Pediatr.*, 137:756-761, 2000.
12. Curione M; Barbato M; Viola F; Francia P; De Biase L; Cucchiara S. Idiopathic dilated cardiomyopathy associated with coeliac disease: the effect of a gluten-free diet on cardiac performance. *Dig Liver Dis.*, 34:866-869, 2002.
 13. Curione M; Danese C; Viola F; Di Bona S; Anastasia A; Cugini P; Barbato M. Carnitine deficiency in patients with coeliac disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 15:279-283, 2005.
 14. De Bem RS; Utiyama SRR; Nisihara RM; Fortunato JA; Tondo JA; Carmes ER; Souza RA; Pisani JC; Amarante HM. Celiac disease prevalence in Brazilian dilated cardiomyopathy patients. *Dig Dis Sci.*, 51:1016-1019, 2006.
 15. Dieterich W; Ehnis T; Bauer M; Donner P; Volta U; Riecken EO; Schuppan D. Identification of the tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.*, 3:797-801, 1997.
 16. Elliott DE; Murray JA; Weinstock JV. Inflammatory bowel and celiac disease. The autoimmune diseases. San Diego: Academic Press., p. 477-509, 1998.
 17. Fasano A; Berti I; Gerarduzzi T; Not T; Colletti RB; Drago S; Elitsur Y; Green PH; Guandalini S; Hill ID; Pietzak M; Ventura A; Thorpe M; Kryszak D; Fornaroli F; Wasserman SS; Murray JA; Horwath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.*, 163:286-92, 2003.
 18. Ferguson A. New perspectives of the pathogenesis of coeliac disease: evolution of a working clinical definition. *J Intern Med.*, 240:315-318, 1996.
 19. Fonager K; Sorensen HT; Norgard B; Thulstrup AM. Cardiomyopathy in Danish patients with coeliac disease. *Lancet*, 354:1561, 1999.
 20. Frustaci A; Cuoco L; Chimenti C; Pieroni M; Fioravanti G; Gentiloni N; Maseri A; Gasbarrini G. Celiac disease associated with autoimmune myocarditis. *Circulation*, 105:2611-2618, 2002.
 21. Fuchtenbusch M; Ziegler AG; Hummel M. Elimination of dietary gluten and development of type 1 diabetes in high risk subjects. *Rev Diabet Stud.*, 1:39-41, 2004.
 22. Gandolfi L; Pratesi R; Cordoba JC; Tauil PL; Gasparin M; Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol.*, 95:689-692, 2000.
 23. Goel NK; McBane RD; Kamath PS. Cardiomyopathy associated with celiac disease. *Mayo Clin Proc.*, 80:674-6, 2005.
 24. Green PH. The Many faces of Celiac Disease: Clinical Presentation of Celiac Disease in the Adult Population. *Gastroenterol.*, 128:74-78, 2005.
 25. Green PH; Jabri B. Celiac disease. *Annu Rev Med.*, 57:207-21, 2006.
 26. Hansen D; Brock-Jacobsen B; Lund E; Bjørn C; Hansen LP; Nielsen C; Fenger C; Lillevang ST; Husby S. Clinical benefit of a gluten-free diet in type 1 diabetic children with screening-detected celiac disease: a population-based screening study with 2 years follow-up. *Diabetes Care*, 29:2452-2456, 2006.
 27. Henderson KN; Tye-Din JA; Reid HH; Chen Z; Borg NA; Beissbarth T; Tatham A; Mannering SI; Purcell AW; Dudek NL; van Heel DA; McCluskey J; Rossjohn J; Anderson RP. A Structural and Immunological Basis for the Role of Human Leukocyte Antigen DQ8 in Celiac Disease. *Immunity*, 27:23-34, 2007.
 28. Kochbati S; Boussema F; Kilani A; Ben Amor G; Ben Dahmen F; Khamassi N; Ben Rhouma S; Kchir MM; Cherif O; Kastalli R; Ayed M; Rokbani L. Antigliadin antibodies in rheumatoid arthritis. *Tunis Med.*, 80:65-69, 2002.
 29. Kotze LM; Utiyama SR; Nisihara RM; Mocelin V; Carvalho RF; Zeni MP; Amarante HM. Comparison of IgA class reticulon and endomysial antibodies for the diagnosis and dietary control in celiac disease. *Arq Gastroenterol.*, 36:177-184, 1999.
 30. Kotze LMS. Distúrbios entéricos da absorção. In: DANI R. *Gastroenterologia Essencial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 237-250, 2001.
 31. Kotze LM; Utiyama SR; Nisihara RM; Zeni MP; de Sena MG; Amarante HM. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. *Arq Gastroenterol.*, 38:94-103, 2001.
 32. Kotze LMS; Utiyama SR; Nisihara RM; de Camargo VF; Ioshii SO. IgA class antiendomysial and anti-tissue transglutaminase antibodies in relation to duodenal mucosa changes in celiac disease. *Pathology*, 35:56-60, 2003.
 33. Kotze LMS. Gynecologic and obstetric findings related to nutritional status and adherence to a gluten-free diet in Brazilian patients with celiac disease. *J Clin Gastroenterol.*, 38:567-74, 2004.
 34. Kotze LMS; Nisihara RM; da Rosa Utiyama SR; Piovezan GC; Kotze LR. Thyroid disorders in Brazilian patients with celiac disease. *J Clin Gastroenterol.*, 40:33-36, 2006.
 35. Kotze LMS. Doença celiaca. In: Lopes AC & Amato Neto V. *Tratado de Clínica Médica*, 1ª ed. São Paulo: Roca, p. 1036-1054, 2006.
 36. Ludvigsson JF; Ludvigsson J; Ekblom A; Montgomery SM. Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care*, 29:2483-8, 2006.
 37. Melo SB; Fernandes MI; Peres LC; Troncon LE; Galvão LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, Sao Paulo State, Brazil. *Dig Dis Sci.*, 51:1020-1025, 2006.
 38. Morris MA; Yiannakou JY; King AL; Brett PM; Biagi F; Vaughan R; Curtis D; Ciclitira PJ. Coeliac disease and Down syndrome: associations not due to genetic linkage on chromosome 21. *Scand J Gastroenterol.*, 35:177-80, 2000.
 39. Nisihara RM; Kotze LM; Utiyama SR; Oliveira NP; Fiedler PT; Messias-Reason IT. Celiac disease in children and adolescents with Down Syndrome from southern Brazil. *J Pediatr.*, 81:373-376, 2005.
 40. Nisihara RM; Skare TL; Silva MB; Utiyama SR. Rheumatoid arthritis and anti-endomysial antibodies. *Acta Reum Port.*, 32:163-167, 2007.
 41. Norris JM; Barriga K; Klingensmith G; Hoffman M; Eisenbarth GS; Erlich HA; Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*, 290:1713-1720, 2003.
 42. Norris JM; Barriga K; Hoffenberg EJ; Taki I; Miao D; Haas JE; Emery LM; Sokol RJ; Erlich HA; Eisenbarth GS; Rewers M. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*, 293:2343-2351, 2005.
 43. Not T; Horvath K; Hill ID; Partanen J; Hammed A; Magazzu G; Fasano A. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol.*, 33:494-498, 1998.
 44. Oliveira RP; Sdepanian VL; Barreto JA; Cortez AJ; Carvalho FO; Bordin JO; de Camargo Soares MA; da Silva Patrício FR; Kawakami E; de Moraes MB; Fagundes-Neto U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 19:43-49, 2007.
 45. Pauly DF; Pepine CJ. The role of carnitine in myocardial dysfunction. *Am J Kidney Dis.*, 41:35-43, 2003.
 46. Pereira MA; Ortiz-Agostinho CL; Nishitokukado I; Sato MN; Damião AO; Alencar ML; Abrantes-Lemos CP; Cañado EL; de Brito T; Ioshii SO; Valarini SB; Sipahi AM. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.*, 12:6546-6550, 2006.
 47. Rodrigo L. Celiac disease. *World J Gastroenterol.*, 12:6585-93, 2006.
 48. Song KS; Choi JR. Tissue transglutaminase autoantibodies in patients with IgM rheumatoid factor. *Yonsei Med J.*, 45:960-963, 2004.
 49. Uibo O; Teesalu K; Metskula K; Reimand T; Saat R; Sillat T; Reimand K; Talvik T; Uibo R. Screening for celiac disease in Down's syndrome patients revealed cases of subtotal villous atrophy without typical for celiac disease HLA-DQ and tissue transglutaminase antibodies. *World J Gastroenterol.*, 12:1430-1434, 2006.
 50. Utiyama SRR; Ioshii S. Doença celiaca: Uma visão atual. *RBAC*, 30:151-154, 1998.
 51. Utiyama SRR. Spectrum of Autoantibodies in Celiac Patients and Relatives. *Dig Dis Sci.*, 46:2624-2630, 2001.
 52. Utiyama SRR; Kotze LMS; Nisihara RM; de Camargo VF. Correlation of anti-endomysial and antitransglutaminase antibodies with celiac disease. *RBAC*, 34:39-45, 2002.
 53. Utiyama SR; Reason IJ; Kotze LM. Genetics and immunopathogenics aspects of the celiac disease: a recent vision. *Arq Gastroenterol.*, 41:121-8, 2004.
 54. Utiyama SRR; Kotze LMS; Reason ITM. Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity of celiac disease in patients and relatives. *Int J Immunogenet.*, 32:307-14, 2005.
 55. Utiyama SR; Nass FR; Kotze LM; Nisihara RM; Ambrosio AR; de Messias-Reason IT. Serological screening of relatives of celiac disease patients:

- antiendomysium antibodies, anti-tissue transglutaminase or both? *Arq Gastroenterol.*, 44:156-61, 2007.
56. Vasquez H; Sugai E; Pedreira S; Katz S; Litwin N; De Rosa S; Ruiz J; Soifer G; Kogan Z; Boerr L; et al. Screening for asymptomatic celiac sprue in families. *J Clin Gastroenterol.*, 21:130-133, 1995.
57. Volta U; Molinaro N; de Franceschi L; Fratangelo D; Bianchi FB. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. *Dig Dis Sci.*, 40:1902-1905, 1995.
58. Ziegler AG; Schmid S; Huber D; Hummel M; Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*, 290:1721-1728, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Laboratório de Imunopatologia
Departamento de Patologia Médica
Rua Padre Camargo, 280
CEP 80060 240
Curitiba – PR

Vantagens em ser sócio da **SBAC**

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas apresenta, pelo menos, quatro importantes motivos para que você se associe à ela, seja como profissional ou como empresa:

1. Criação de identidade corporativa

Associando-se à SBAC, o profissional de análises clínicas assume uma identidade corporativa, em uma entidade ativa, capaz de representá-lo, que cuida de interesses comuns e pertinentes à área de saúde e, especificamente, aos laboratórios clínicos e bancos de sangue, junto aos mais diversos órgãos (nacionais e internacionais, sejam governamentais ou não) que têm influência na atividade laboratorial, objetivando o crescimento e o desenvolvimento de todos, independente do seu tamanho ou localização.

2. Certificação profissional

A SBAC é a entidade nacional competente para emitir o Título de Especialista em Análises Clínicas, titulação reconhecida por instituições da área de saúde, privadas e governamentais e pelos profissionais, como um importante diferencial competitivo.

3. Descontos no PNCQ

Ser sócio da SBAC, também, dá a oportunidade de desconto de 33% no mais importante programa de Ensaios de Proficiência para Laboratórios Clínicos e Bancos de Sangue do país. O PNCQ auxilia e oferece opções para o aprimoramento da qualidade dessas empresas.

4. Atualização profissional

Ser sócio da SBAC dá ao profissional de laboratório uma série de oportunidades de atualização profissional, científica e em gestão de laboratórios.

E para isso, a SBAC possui vários instrumentos, com vantagens exclusivas para sócios; sem nenhum custo:

- ✎ Como sócio da SBAC recebe um exemplar de cada edição da Revista Brasileira de Análises Clínicas, RBAC, a partir de sua associação.
- ✎ Como sócio da SBAC também, recebe um exemplar de cada edição do SBAC jornal, trazendo as atualidades e notícias referentes à área e ao trabalho da SBAC em si, a partir de sua associação.
- ✎ Ainda, descontos significativos de 50% na sua participação em cursos, seminários, eventos e congressos.

Finalmente, com tantos bons motivos, não há porque não ser sócio da mais importante entidade científica na área laboratorial do país.

Associe-se à **SBAC**

PRÊMIO HOTSOFT INFORMÁTICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Hotsoft Informática" - é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio da Hotsoft Informática Ltda;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 3.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC, nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas.

II - DOS OBJETIVOS

- O "Prêmio Hotsoft Informática" tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de soluções que atendam às necessidades dos Laboratórios de Análises Clínicas em qualquer de suas especialidades na área de informática; e
 - 2) Premiar o melhor Programa (Software) inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os Programas (Softwares) inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio Hotsoft Informática, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias do programa original completo em disquete ou CD, com o seu respectivo manual de utilização;
- 3) Os Programas concorrentes deverão ser originais no país e no estrangeiro, não publicados ou comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade, e nem tão pouco já comercializados;
- 4) O Programa premiado será obrigatoriamente divulgado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais Programas selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio, poderão ser divulgados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o programa e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será escolhida antecipadamente e publicada no programa oficial do Congresso;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores Programas apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hotsoft Informática, e aos outros 02 (dois) será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A Comissão Julgadora anunciará a sua decisão final após avaliar todos os Programas apresentados;
- 5) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecurável.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio é indivisível e será conferido a apenas um programa, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Programa concorrente ao prêmio, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores do Programa regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) A Hotsoft manterá seção permanente em seu site na internet para divulgar o resumo dos trabalhos inscritos e uma versão demonstrativa dos programas vencedores nas diversas edições do Prêmio;
- 5) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hotsoft Informática

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Ensaios clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L.(vitaceae) em pacientes intolerantes à glicose e em diabéticas tipo 2*

Clinical trials with the leaves of *Cissus sicyoides* L. (vitaceae) in glucose-intolerant and in type 2 diabetic patients*

Hosana Bandeira Santos¹, João Modesto Filho², Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz³, Tereza Helena Cavalcanti de Vasconcelos⁴, Francisco Santiago de Brito Pereira⁵, Josué do Amaral Ramalho⁶, Jadson Gomes Dantas⁶, Esther Bandeira Santos⁷

RESUMO - A *Cissus sicyoides* é popularmente empregada para o tratamento do diabetes e é conhecida como insulina vegetal. Realizou-se ensaios clínicos de fase II com o infuso das folhas da referida planta, para investigar a eficácia terapêutica, desse vegetal, em voluntárias intolerantes à glicose (GIG n=14) e diabéticas tipo 2 (GD n=12). Preparou-se o chá com 1g do pó das folhas secas, diluído em 150 mL de água quente por 10 minutos (uso popular), dose única. A atividade foi avaliada nos tempos basal, 30^o e 60^o dias. Aplicou-se questionário para reações adversas e realizaram-se exames clínicos e laboratoriais no Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. Os dados foram analisados estatisticamente e o nível de significância foi de 5,0 %. Observou-se que: as voluntárias não exerciam atividade física, possuíam parentes com diabetes, eram hipertensas e obesas; o IMC do GD reduziu significativamente com 60 dias; houve redução da glicemia, mas sem diferença significativa e ocorreu diferença significativa da frutossamina em 30 e em 60 dias, entre os grupos. Concluiu-se que, nesse estudo, não foi evidenciado efeito hipoglicemiante significativo, nas voluntárias, e que nas doses utilizadas, a *Cissus sicyoides* não causou alterações clínicas e laboratoriais confirmando a segurança da utilização da mesma, como alimento, pela população.

PALAVRAS-CHAVE - *Cissus sicyoides*, diabetes tipo 2, intolerantes à glicose, ensaios clínicos de fase II.

SUMMARY - *Cissus sicyoides* L is popularly utilized in the treatment of diabetes, and it is known as vegetal insulin. Phase II clinical trials were carried with the infusion of leaves of this plant to investigate the therapeutical effectiveness of this vegetal in glucose-intolerant (GIG n=14) and in type 2 diabetic (GD n=12) patients. The infusion was prepared with 1g of the dust falling leaves diluted in 150 mL of hot water (popular usage), in single doses. The effects were evaluated in the intervals basal, 30th day and 60th day. A questionnaire was utilized to verify the side effects, and the clinical trials were carried through in the Hospital Universitário Lauro Wanderley of the UFPB. The results were statistically analyzed, and the significance level was 5,0%. It was observed that: the voluntaries did not exercise, had diabetic relatives, and were hipertense and obese; the BMI of the GD was considerably reduced within 60 days; glycemia was reduced, but not considerably, and the frutossamin showed considerable difference in 30 and in 60 days, between the groups. It was concluded, in this study, that considerable hypoglycemic activity was not revealed in the voluntaries, and that the doses of *Cissus sicyoides* utilized did not lead to alterations of clinical and laboratorial standards, confirming the safety of this plant's usage as a food by the population.

KEYWORDS - *Cissus sicyoides*, type 2 diabetes, glucose intolerance, clinical trials.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, que é o resultado de defeitos na ação da insulina e/ou na sua secreção⁴³.

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento e inclui quatro classes distintas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e Diabetes Gestacional. Existem ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída; essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares¹.

A Federação Internacional de Diabetes (FID, 2003)²⁴ calcula que 5,1% da população mundial adulta (20 a 79 anos de idade) está diabética, e que essa cifra aumentará a 6,3% para o ano de 2025. Em relação aos intolerantes à glicose, os valores são de 8,2% da população adulta, e para 2025 espera-se alcançar 9,0%. A concentração de diabetes é duas vezes maior na área urbana do que na área rural, e a faixa etária de maior prevalência para ambos os grupos é de 40 a 59 anos de idade, sendo que o gênero feminino ultrapassa em 10% em relação ao masculino. Em relação à etnia, há desenvolvimento maior de diabetes em asiáticos, latino-americanos, povos indígenas (Estados Unidos da América, Canadá e Austrália); o índice mais alto do mundo está entre os índios Pima (EUA).

Recebido em 14/12/2007

Aprovado em 16/01/2009

*Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Prof. Delby Fernandes de Medeiros" e no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW)/UFPB. Esse estudo foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba/FAPESQ.

¹Farmacêutica-Bioquímica e Doutorado do Curso de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/Laboratório de Tecnologia

Farmacêutica/Universidade Federal da Paraíba;

²Departamento de Medicina Interna/UFPB;

³Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB;

⁴Departamento de Nutrição/UFPB;

⁵Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB;

⁶Graduando do Curso de Farmácia/UFPB.

⁷Graduanda do Curso de Odontologia/UFPB.

O Brasil possui 5,7 milhões de diabéticos e está em 7º lugar no ranking mundial¹². Na Paraíba, de acordo com o Ministério da Saúde, existem 135 mil diabéticos, e a grande maioria, 37,5 mil, está concentrada na cidade de João Pessoa¹³.

A incidência de DM tipo 2 na atualidade atinge proporções epidêmicas, demandando um alto custo tanto econômico quanto social³.

O impacto econômico do diabetes no Brasil é relevante, acarretando custo de 2,2% do orçamento executado do Ministério da Saúde só com hospitalizações atribuíveis a essa patologia. O tempo médio de permanência nas internações é de 6,5 dias, e esses dados são equivalentes aos de outros países em desenvolvimento. Observa-se que o custo não é específico apenas dos cuidados da doença em si, mas também do custo indireto causado pela perda da produtividade por incapacidade e mortalidade prematura. Na América Latina e no Caribe, os custos indiretos são maiores do que os diretos por causa do limitado acesso à saúde^{6,40}.

O tratamento do DM tipo 2 inclui dentre outras estratégias: educação, modificações no estilo de vida, reorganização dos hábitos alimentares e se necessário, uso de medicamentos. O tratamento medicamentoso apresenta duas modalidades diferentes: a insulino terapia e a terapia com os antidiabéticos orais. Novos grupos terapêuticos como as tiazolidinedionas, os inibidores da α glicosidase, as sulfoniluréias de terceira geração, a metformina e os análogos de insulina com ação ultra rápida encontram-se disponíveis, permitindo opção mais lógica e condizente com mecanismo fisiopatológico da patologia^{2,44,21,22}.

Por outro lado, apesar da disponibilidade de todo esse arsenal terapêutico, em geral, apresentando altos custos ao paciente, a dificuldade ao acesso a tratamentos médicos e a vasta tradição da população no uso de plantas é que se tem recorrido a terapias alternativas para o controle da hiperglicemia como o uso de plantas medicinais.

Desde a Antigüidade, o homem faz uso de plantas medicinais para o tratamento de seus males. Com o aprimoramento da ciência e da tecnologia, plantas antes nunca exploradas são caracterizadas e valorizadas atualmente por suas propriedades farmacológicas, aumentando consideravelmente o desenvolvimento de produtos naturais¹⁹. Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 80% da população mundial consome remédios de origem natural. No Brasil, ocorre o mesmo, sendo um dos países que possuem maior biodiversidade no mundo. Visto que, de 1,4 milhão de organismos catalogados, 10% encontram-se nesse País, com destaque para os vegetais superiores, que somam 55 mil espécies. Esse fato, associado à tradição popular no uso de plantas, para tratamento das suas necessidades básicas de saúde, oriunda dos povos indígenas, da influência africana e da colonização européia, como expressão da sua diversidade cultural¹¹.

Sendo assim, tem aumentado a atenção das autoridades ligadas à saúde com relação ao uso de plantas medicinais. A aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, prevendo o tratamento com plantas medicinais e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde-SUS, conforme disposto na Portaria no 971, de 03 de maio de 2006¹⁴, do Ministério da Saúde; e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto no 5813, de 22 de Junho de 2006¹⁰, constitui incentivo ao mercado interno sem precedentes na história do País.

Em estudo de revisão sobre plantas e compostos hipoglicemiantes nas Américas do Norte, Central e do Sul, Barbosa-Filho *et al* (2005)⁵ enumeraram 224 plantas e 40

compostos com atividade hipoglicemiante. As dez famílias mais citadas foram: *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Labiatae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Anacardiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rubiaceae* e *Liliaceae*. Das 224 plantas estudadas, 73 (33%) foram encontradas na América do Sul, 77 (34%) na América Central e 74 (33%) na América do Norte. Os países que mais contribuíram com o estudo das plantas foram Brasil (23%), México (24%) e Estados Unidos (31%). As espécies mais citadas na literatura científica de cada país foram a *Bauhinia forficata* (Brasil), a *Opuntia streptacantha* (México) e *Avena sativa* (EUA). Os mesmos autores relatam que no Brasil, cerca de 200 plantas são usadas empiricamente para o controle do DM. Das quais, 52 têm sido avaliadas e tem-se encontrado atividade hipoglicemiante na maioria delas, dentre as quais, o gênero *Cissus*, o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies distribuídas entre as Américas, à Ásia e a Austrália.

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* L. é uma trepadeira conhecida popularmente como anil trepador; cipó-pucá, cipó-puci, puçá, tinta dos gentios, cortina de pobre, uva brava e insulina vegetal. As folhas são empregadas externamente contra o reumatismo e para a cura de abscessos; a infusão das folhas e do caule é utilizada na inflamação muscular, nas epilepsias, no derrame cerebral, como sudorífera, hipotensora e ativadora da circulação sanguínea. Essa espécie vem sendo muito empregada pela população para o tratamento de diabetes, sendo por isso conhecida como "insulina" e motivo para estudos botânicos, químicos e farmacológicos^{7,25,33,37,42}.

Várias pesquisas farmacológicas de ação hipoglicemiante e antilipêmica têm sido realizadas com extratos fluidos, decocção, infuso e extrato aquoso de *C. sicyoides*, em ratos normais e diabéticos, tanto de forma aguda como crônica, verificando-se a diminuição da glicemia e dos triglicerídeos nos mesmos. Também se observou, em estudos farmacognósticos, que a composição química das folhas e talos não se alterou, nem mesmo qualitativamente, durante a secagem. Os autores concluem que os resultados justificam o uso popular de *Cissus sicyoides* e o potencial benefício dessa planta na medicina alternativa e no tratamento do DM tipo 2^{9,42,32,7,37,48}.

Vasconcelos (2004)⁴⁶ realizou ensaio toxicológico clínico de fase I utilizando o pó das folhas da referida planta, sob a forma de infusão, na dose de uso popular. Observou-se baixa toxicidade tanto na fase aguda como na fase crônica, não comprometendo a investigação do uso de *Cissus sicyoides* como alimento com alegação e propriedade de saúde. O estudo de fase II é realizado com um pequeno número de pacientes portadores da patologia que se pretende estudar e com administração do produto. O que se busca nessa fase é: estabelecer a eficácia clínica e a incidência de reações adversas; definir os esquemas posológicos mais apropriados; e coletar dados farmacológicos, farmacocinéticos e metabólicos para aprimorar a utilização do fármaco. Ao fim dessa fase, os pesquisadores terão reunido cerca de 65% de todo o conhecimento sobre o fármaco¹⁸.

É nesse contexto que se busca contribuir ao estudo do problema proposto, no sentido de verificar formulações teóricas que ainda não foram abordadas experimentalmente, porém plausíveis em termos de fundamentação e, sobretudo, diante da inexistência de ensaios clínicos com esse objetivo publicados até o momento.

De modo que, o objetivo desse trabalho foi realização de estudos farmacológicos clínicos de fase II com o infuso das folhas de *Cissus sicyoides* através da investigação da eficácia terapêutica desse vegetal em humanos intolerantes à glicose e em diabéticos do tipo 2.

Esse trabalho foi realizado respaldado na legislação aplicável, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras das Pesquisas envolvendo Seres Humanos, de acordo com as Resoluções N° 196/96¹⁶, N° 251/97¹⁷ do Conselho Nacional de Saúde/MS.

METODOLOGIA

MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Cissus sicyoides* L. foram obtidas no horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Delby Fernandes de Medeiros" da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde a planta é cultivada. Amostra representativa encontra-se no herbário Lauro Pires Xavier, localizado no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/UFPB).

Obtenção dos "sachês do chá" de *Cissus sicyoides*

As folhas foram desidratadas em estufa com ar circulante, a 40 °C, por 72h e trituradas em moinho tipo Harley, obtendo-se um rendimento médio de 12%. As folhas secas foram encaminhadas para a APLAF-Comércio e Indústria Ltda, localizada no município de Itatiba – São Paulo, para a confecção dos "sachês do chá" da planta, que continham 1 grama do pó das folhas.

Preparação do Infuso

O infuso de *Cissus sicyoides* L. utilizado na pesquisa foi preparado pelo próprio voluntário, mediante informações da pesquisadora.

Distribuiu-se aos voluntários uma caneca padronizada para o preparo da infusão que consistiu em verter água em ebulição (150 mL) sobre o sachê, por 10 minutos. O infuso foi ingerido diariamente, no turno da manhã, durante 60 dias.

ESTUDOS CLÍNICOS

Para a realização dos estudos clínicos com seres humanos a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley sob processo número 565 em 27/07/2004.

O estudo foi desenvolvido no período de janeiro de 2005 a setembro de 2006 envolvendo pacientes, de ambos os sexos, intolerantes à glicose e pacientes diabéticos tipo 2, entre 30 e 59 anos de idade.

Os ensaios clínicos foram realizados no ambulatório do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da UFPB, com a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa, inclusive para atender eventuais problemas resultantes da mesma. Os eletrocardiogramas (ECG) foram realizados no Setor de Cardiologia do Ambulatório do referido Hospital e os exames laboratoriais e hematológicos, no Laboratório de Análises Clínicas do HULW/UFPB.

Protocolo Experimental

Foi elaborado protocolo experimental com o objetivo de registrar todo o acompanhamento, nos intervalos: basal e após 7, 30, e 60 dias, através de agenda de acompanhamento com datas e horário para a realização dos exames.

Na avaliação clínica basal, o paciente comparecia ao Hospital Universitário às 07h da manhã, em jejum de 12 horas e era coletado sangue em tubos com o anticoagulante EDTA (para determinação de parâmetros hematológicos) e em tubos de 10 mL com gel separador Microtainer Becton Dickson para determinação de parâmetros bioquímicos (glicose, uréia, creatinina, colesterol total e frações, triglicerídeos, ácido úrico, proteínas

totais e frações, AST, ALT, fosfatase alcalina, creatina quinase, GGT, desidrogenase láctica, amilase, bilirrubina total e frações, sódio, potássio, magnésio e cálcio total). A urina e o material fecal foram trazidos pelo paciente do seu domicílio, acondicionados em coletores apropriados. Em seguida, era realizado o exame físico, a verificação da pressão arterial, a mensuração de peso e altura, o registro do eletrocardiograma e a aplicação dos questionários.

Do segundo dia em diante, os voluntários começaram a ingerir o infuso das folhas de *Cissus sicyoides* e, nos dias previamente agendados para acompanhamento, os mesmos retornaram ao HULW/UFPB para as avaliações subsequentes, seguindo a mesma rotina descrita acima.

Durante todo o curso dos experimentos, os voluntários foram instruídos a comunicarem, aos pesquisadores, qualquer sinal ou sintoma clínico que porventura vierem a apresentar. Foram considerados critérios de exclusão os pacientes que demonstraram alterações laboratoriais clinicamente importantes nos exames de análises clínicas, que revelaram disfunção hepática, renal, diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2 com uma glicemia de jejum maior de 180 mg/dL, alterações patológicas graves, grávidas, nutrizes, alcoólatras ou que estivessem em uso de medicação para diabetes. Também foram excluídos aqueles pacientes que eram domiciliados geograficamente distantes do centro de pesquisa (HULW), não garantindo assim a estabilidade no acompanhamento clínico.

A seleção dos pacientes ocorreu através de amostragem não aleatória, por conveniência, entre homens e mulheres, na faixa etária entre 30 e 59 anos que procuraram o Ambulatório de Endocrinologia e de nutrição do HULW, como também os que frequentavam os Centros de Referência em Diabetes tanto do Estado como do Município de João Pessoa. Da mesma forma, foram recrutados pacientes através de campanhas realizadas dentro da UFPB entre os funcionários da mesma e em Programas de Ação Social nas comunidades do Porto do Capim e Cidade Verde em Mangabeira VIII.

Dos pacientes que iniciaram a pesquisa (30 homens e 65 mulheres), apenas 26 mulheres concluíram o tratamento. As voluntárias pré-selecionadas foram distribuídas em 2 grupos: Grupo das Intolerantes à Glicose (GIG, n=14) e o Grupo das Diabéticas (GD, n=12).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros avaliados foram observados através da existência ou não diferença significativa entre os dois grupos para cada uma das avaliações em relação à média dos parâmetros: peso, IMC, dados bioquímicos, dados hematológicos e outros; assim como também da existência ou não diferença significativa entre a avaliação basal e cada uma das outras avaliações em cada grupo para cada uma das médias dos parâmetros relatados anteriormente.

Os dados foram digitados na planilha Excel, e o "software" estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 13. O nível de significância utilizado nas decisões dos testes estatísticos foi de 5,0%.

RESULTADOS

As pacientes não praticavam nenhuma atividade física, a maioria tinha histórico familiar de diabetes (GIG: 71,4% e GD: 50%), eram hipertensas e faziam uso de uso de propranolol e hidroclortiazida (GIG: 42,8% e GD: 50%)

(Fig.1). Em relação ao índice de massa corporal (IMC), observou-se que houve redução do mesmo no decorrer do tratamento em ambos os grupos, porém só foi observada diferença significativa, entre os tempos (basal, 7, 30 e 60 dias), no Grupo das Diabéticas, mas mesmo assim a maioria concluiu o tratamento com o índice de massa corporal que caracterizava obesidade (Fig. 2).

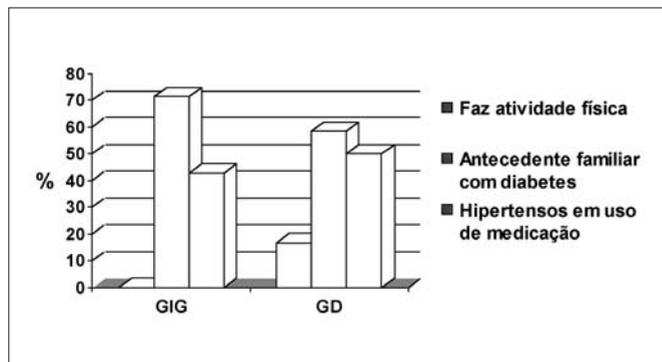


Figura 1 - Porcentagem de respostas afirmativas quanto a atividade física, antecedente familiar diabético e hipertensão

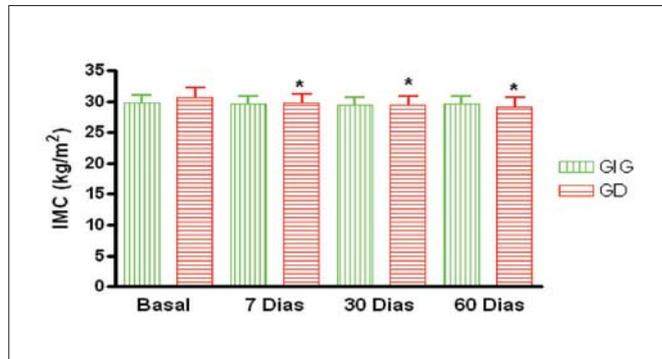


Figura 2 - Avaliação nutricional dos grupos, segundo o Índice de Massa Corporal (Kg/m²). * p<0,05 entre os tempos.

Nos resultados da pressão arterial verificou-se que, ambos os grupos, não apresentaram alterações significativas tanto da pressão arterial sistólica como da pressão arterial diastólica durante o uso do infuso. Todas as medidas estavam dentro dos limites de normalidade clínica. No ECG, observou-se que, em relação ao ritmo, apenas uma paciente do GIG apresentou ritmo juncional do início até o final do tratamento. Não houve diferença significativa do ritmo entre grupos e entre o tempo de tratamento. Como conclusão do ECG, apenas 1/14 paciente do GIG apresentou alterações inespecíficas da repolarização ventricular, e 1/14 do mesmo grupo apresentou bloqueio dimensional ântero-superior esquerdo. Essas alterações ocorreram do início até o final do tratamento, não estando, portanto, relacionados ao infuso; as demais pacientes de ambos os grupos tiveram o laudo normal. No estudo hematológico verificou-se que os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência, não caracterizando diferenças significativas entre os grupos estudados e nem no decorrer do tratamento, ou seja, as pacientes ainda não estavam apresentando distúrbios hematológicos próprios dessas patologias (Tab. I, II, III e IV).

TABELA I
Dados dos parâmetros hematológicos das variáveis relativas à série vermelha segundo o grupo

Variável VR	Tempo de avaliação	Grupo	
		GD (n = 12) Média ± DP ⁽¹⁾	GIG (n = 14) Média ± DP
• Hemácias (milhões/mm ³) (3,8 - 5,2)	Basal	4,75 ± 0,37	4,60 ± 0,61
	7 dias	4,85 ± 0,49	4,51 ± 0,55
	30 dias	4,82 ± 0,41	4,54 ± 0,70
	60 dias	4,86 ± 0,47	4,63 ± 0,66
• Hemoglobina (11,1-16,1 g/dL)	Basal	13,63 ± 0,91	13,15 ± 1,38
	7 dias	13,93 ± 1,15	12,99 ± 1,24
	30 dias	13,78 ± 0,88	13,06 ± 1,44
	60 dias	13,97 ± 0,97	13,73 ± 2,24
• Hematócrito (35 - 47 %)	Basal	41,06 ± 2,78	39,95 ± 4,13
	7 dias	41,79 ± 3,92	39,24 ± 3,50
	30 dias	41,54 ± 3,24	39,37 ± 5,01
	60 dias	42,36 ± 3,43	40,10 ± 4,77
• VCM (80 - 98 μm ³)	Basal	85,93 ± 3,09	87,16 ± 4,51
	7 dias	86,34 ± 4,27	87,21 ± 5,46
	30 dias	86,20 ± 3,63	87,14 ± 4,71
	60 dias	86,74 ± 3,61	87,57 ± 4,47
• HCM (26 - 34 μg)	Basal	28,60 ± 2,12	28,86 ± 1,97
	7 dias	28,83 ± 2,00	29,02 ± 2,41
	30 dias	28,66 ± 2,13	29,01 ± 2,28
	60 dias	28,67 ± 2,20	28,24 ± 3,11
• CHCM (31 - 36 g/dL)	Basal	33,24 ± 1,72	33,00 ± 0,94
	7 dias	33,34 ± 1,04	33,07 ± 0,99
	30 dias	33,19 ± 1,35	33,26 ± 1,09
	60 dias	33,00 ± 1,47	32,91 ± 1,07

(1) DP – Desvio padrão.

TABELA II
Dados dos parâmetros relativos ao RDW e série plaquetária segundo o grupo

Variável VR	Tempo de avaliação	Grupo	
		GD (n = 12) Média ± DP ⁽¹⁾	GIG (n = 14) Média ± DP
• RDW (10,5 - 14,5%)	Basal	13,43 ± 0,55	13,84 ± 0,84
	7 dias	13,68 ± 0,89	13,61 ± 0,83
	30 dias	13,53 ± 0,64	13,58 ± 0,88
	60 dias	13,53 ± 0,71	13,48 ± 0,76
• Plaquetas (mil/mm ³) (150,0 - 450,0)	Basal	238,67 ± 52,85	244,29 ± 61,73
	7 dias	232,25 ± 54,74	241,14 ± 67,99
	30 dias	242,67 ± 45,69	236,43 ± 65,50
	60 dias	245,58 ± 60,37	256,29 ± 56,47

(1) DP – Desvio padrão.

TABELA III
Dados dos parâmetros hematológicos relativos aos leucócitos (mm³) e à celularidade da série branca, apresentados em % e em mm³, segundo o grupo

Variável VR	Tempo de avaliação	Grupo	
		GD (n = 12) Média ± DP ⁽¹⁾	GIG (n = 14) Média ± DP
• Leucócitos (mil/mm ³) (3,6 - 11,0)	Basal	6,67 ± 1,50	6,96 ± 1,81
	7 dias	6,41 ± 1,43	6,72 ± 1,40
	30 dias	7,16 ± 1,80	6,86 ± 1,19
	60 dias	6,82 ± 2,55	6,72 ± 1,65
• Segmentados (45 - 70 %)	Basal	58,42 ± 8,78	59,93 ± 7,88
	7 dias	54,67 ± 10,37	57,64 ± 9,34
	30 dias	57,42 ± 8,58	58,21 ± 8,25
	60 dias	55,58 ± 10,90	57,29 ± 5,59
• Segmentados (1500 - 7000/mm ³)	Basal	4001,85 ± 1478,64	4210,21 ± 1322,34
	7 dias	3588,35 ± 1241,82	3903,71 ± 1137,25
	30 dias	4084,54 ± 1443,03	3941,99 ± 754,91
	60 dias	3818,83 ± 1552,14	3862,55 ± 1106,65
• Eosinófilos (0,1 - 6 %)	Basal	3,25 ± 4,11	4,00 ± 3,16
	7 dias	4,25 ± 6,62	4,36 ± 5,06
	30 dias	4,83 ± 5,44*	4,64 ± 3,50
	60 dias	5,08 ± 6,05	3,64 ± 1,95
• Eosinófilos (36 - 660/mm ³)	Basal	232,89 ± 351,48	269,53 ± 199,79
	7 dias	282,05 ± 498,16	267,62 ± 246,76
	30 dias	472,94 ± 642,84	318,26 ± 236,54
	60 dias	722,93 ± 1807,91	223,22 ± 111,39

(1) DP – Desvio padrão.

(2) (*) Diferença significante a 5,0 % entre os tempos.

TABELA IV
Dados dos parâmetros hematológicos relativos à celularidade da série branca, apresentados em % e em mm³, segundo o grupo

Variável VR	Tempo de avaliação	Grupo	
		GD (n = 12) Média ± DP ⁽¹⁾	GIG (n = 14) Média ± DP
• Linfócitos (20 - 50 %)	Basal	33,92 ± 9,74	32,79 ± 6,44
	7 dias	37,25 ± 10,82	34,14 ± 9,29
	30 dias	33,67 ± 9,08	32,07 ± 8,19
	60 dias	34,58 ± 11,37	34,21 ± 5,69
• Linfócitos (720 - 5500/mm ³)	Basal	2144,99 ± 304,65	2277,30 ± 621,32
	7 dias	2295,43 ± 530,56	2268,16 ± 692,27
	30 dias	2243,71 ± 491,87	2208,39 ± 718,21
	60 dias	2225,62 ± 592,60	2286,83 ± 647,41
• Monócitos (2 - 10 %)	Basal	4,33 ± 2,19	3,29 ± 1,94
	7 dias	3,83 ± 2,66	3,86 ± 2,66
	30 dias	4,08 ± 2,43	5,00 ± 2,66*
	60 dias	4,58 ± 2,39	4,79 ± 2,29*
• Monócitos (72 - 1100/mm ³)	Basal	280,08 ± 173,04	240,69 ± 175,69
	7 dias	247,80 ± 176,34	279,75 ± 222,52
	30 dias	324,55 ± 171,13	351,12 ± 212,91*
	60 dias	332,70 ± 247,05	330,32 ± 174,64*

(1) DP – Desvio padrão. (*) Diferença significante a 5,0 % entre os tempos.

Os resultados da glicemia e da frutossamina estão apresentados nas Figuras 3 e 4. Os valores médios de glicemia foram maiores no GD do que no GIG em todos os tempos de avaliação, e, mesmo ocorrendo redução da glicemia, com o uso crônico do chá, só ocorreu diferença significativa entre os grupos. Na avaliação da frutossamina, as médias foram maiores no GD do que no GIG e que diferenças significativas foram registradas com 30 e com 60 dias entre os grupos.

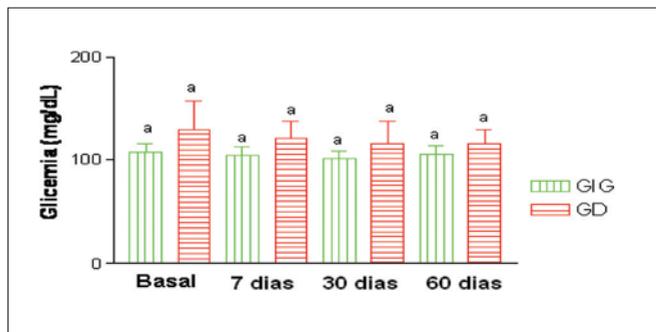


Figura 3 - Valores médios e desvio padrão de glicemia segundo o grupo e tempo de avaliação. a p < 0,05 entre os grupos

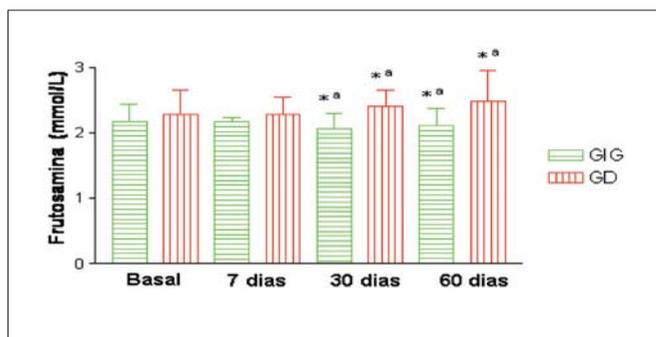


Figura 4 - Valores médios e desvio padrão de frutossamina segundo o grupo e tempo de avaliação a p < 0,05 entre os grupos * p < 0,05 entre os tempos

Não foi constatada nenhuma alteração significativa nos resultados dos parâmetros bioquímicos, com exceção do perfil lipídico apresentado na tabela V. Essa tabela mostra que as pacientes encontravam-se fora dos valores de referência em todas as determinações, menos o colesterol total. Apesar da melhora desses parâmetros, com o uso do infuso por 60 dias, não ocorreu diferença significativa entre as avaliações de cada grupo e entre a avaliação basal e as outras avaliações.

TABELA V

Valores médios das variáveis: colesterol total e frações (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL) segundo o grupo e o tempo de avaliação

Variável	Tempo de Avaliação	Grupo	
		GD (n = 12) Média ± DP ⁽¹⁾	GIG (n = 14) Média ± DP
•Colesterol total (< 200)	Basal	208,67 ± 26,00	196,50 ± 32,91
	7 dias	194,25 ± 48,76	197,43 ± 33,99
	30 dias	188,33 ± 26,60*	187,43 ± 31,82
	60 dias	200,25 ± 38,18	189,07 ± 39,91
•Colesterol HDL (≥ 60)	Basal	42,92 ± 11,90	43,50 ± 7,86
	7 dias	46,17 ± 13,07	44,29 ± 9,23
	30 dias	44,08 ± 9,40	44,71 ± 8,16
	60 dias	47,00 ± 11,47	46,14 ± 7,53
• Colesterol LDL (<100)	Basal	122,75 ± 25,43	120,23 ± 27,45
	7 dias	112,45 ± 44,02	117,13 ± 33,81
	30 dias	99,80 ± 29,47*	110,74 ± 19,73
	60 dias	118,42 ± 33,25	111,99 ± 35,51
• Colesterol VLDL (<30)	Basal	43,00 ± 22,15	32,77 ± 13,80
	7 dias	35,63 ± 16,98	35,99 ± 15,59
	30 dias	44,45 ± 22,39	31,97 ± 18,59
	60 dias	34,83 ± 19,53	30,94 ± 17,69
• Triglicerídeos (<150)	Basal	215,00 ± 110,76	149,86 ± 57,54
	7 dias	178,17 ± 84,91	179,93 ± 77,84
	30 dias	222,25 ± 111,94	159,86 ± 92,86
	60 dias	174,17 ± 97,64	154,71 ± 88,43

(1) DP – Desvio padrão. (*) Diferença significativa a 5,0 % entre os tempos.

Na pesquisa coprológica das pacientes, observou-se índice de positividade de 57,14% no GIG e 41,6% no GD (Fig. 5). A maior incidência, em ambos os grupos, foi de protozoários superior, portanto à de helmintos. Os protozoários que apareceram em maior frequência foram os cistos de *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba coli*. Apenas três voluntárias tinham associação com *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermiculares* e *Hymenolepis nana*. Todas as pacientes foram tratadas das parasitoses antes de iniciar o estudo para evitar interferência na sintomatologia das reações adversas.

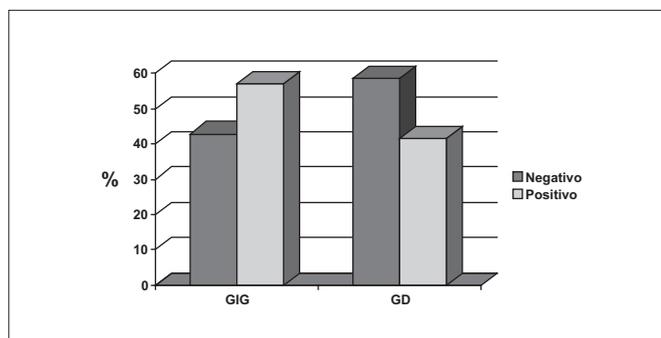


Figura 5 - Índice de positividade (%) do Parasitológico de fezes por grupo

Ao longo do tratamento com as folhas da referida planta, foram observadas poucas alterações nas reações adversas em grande parte das pacientes. Apesar das voluntárias relatarem vários sintomas na avaliação basal, a maior parte permaneceu estável ao final do estudo. Houve tendência de estabilidade à melhora dos sintomas ou então ausência de alteração da sintomatologia ao final dos 60 dias.

Destaca-se que a insônia diminuiu em ambos os grupos: no grupo de intolerantes, de (3/14) para (1/14); da mesma forma no grupo de diabéticas, de (3/12) para (1/12). A tontura também diminuiu de 5/14 para (1/14) no GIG e de (6/12) para (4/12) no GD. A mesma tendência foi observada quanto ao item dor nas costas, havendo redução dessa sintomatologia nos dois grupos: GIG de (7/14) para (4/14) e GD de (5/12) para (2/12). Entretanto, verifica-se que a sonolência no grupo de intolerantes foi exacerbada de (1/14) para (5/14). É interessante ressaltar, que exceto a sonolência, nenhum sintoma novo apareceu ao longo do tratamento, o que aponta ausência de reações adversas.

DISCUSSÃO

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* é conhecida como insulina vegetal e é muito utilizada pela população, na forma de infusão, para o tratamento do diabetes melito e, segundo Vasconcelos *et al* (2002)⁴⁵, é alimento com propriedades de saúde. A ANVISA define esse tipo de alimento como aquele que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento com doença ou condição relacionada à saúde conforme RESOLUÇÃO no 18/99 da ANVISA¹⁵. No entanto, estudos clínicos precisam ser realizados para comprovar as propriedades terapêuticas dessa espécie em pacientes diabéticos. O presente estudo propõe-se a verificar a eficácia do tratamento com as folhas secas de *Cissus sicyoides* em pacientes intolerantes à glicose e em diabéticos tipo 2. O perfil das voluntárias, acima apresentado, corrobora com outros dados da literatura que relacionam diabetes tipo 2 ou o seu estágio pré-diabético com o aumento de peso e doenças cardiovasculares^{26,27,49}.

Já foi demonstrado que a resistência à insulina (RI) está associada com a estimulação de progenitores eritrocitários e com níveis aumentados de marcadores inflamatórios. Dessa maneira, a RI pode também estar associada ao aumento de hemácias e leucócitos, e essas alterações hematológicas podem ser consideradas um achado indireto da síndrome de resistência à insulina. A síndrome metabólica está presente em processos inflamatórios, pois citocinas como o TNF α e a IL-6 estão associadas à RI com formação de placa aterosclerótica²³. A leucocitose está presente na obesidade, na intolerância à glicose e está associado a complicações no diabetes melito tipo 2⁴⁷.

Zago *et al*, (2004)⁵⁰, relataram que a sobrevivência das plaquetas está reduzida em algumas condições clínicas como a trombocitopenia induzida por drogas, o diabetes, aterosclerose coronariana e na síndrome da imunodeficiência adquirida. As pacientes que realizaram o tratamento eram recém diagnosticadas e não apresentavam ainda alterações hematológicas. Santos *et al* (2006)⁴¹, avaliaram o efeito agudo do infuso de *Cissus sicyoides* em pacientes intolerantes à glicose. Nesse estudo realizou-se duas curvas glicêmicas (TOTG), a primeira sem o uso do chá das folhas de *Cissus sicyoides*, e a segunda, com a ingestão do chá trinta minutos antes da carga de glicose. Observou-se que, quando as pacientes ingeriram o chá, este foi capaz de reduzir os valores de glicemia em todos os tempos, ocorrendo diferença significativa apenas no tempo de duas horas. Paralelamente, foi realizada a dosagem de insulina nas mesmas amostras do TOTG, e observou-se que não houve aumento da insulina, além do esperado fisiologicamente, donde se conclui que o mecanismo de ação da planta na redução da glicemia, através da prova funcional aplicada, não envolveu aumento na liberação de insulina. Algumas plantas produzem efeitos periféricos (extra-pancreáticos) sobre o metabolismo dos carboidratos sem alterar os níveis de insulina^{9,30}.

Estudos pré-clínicos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a atividade antibiobética da *Cissus sicyoides* e os resultados são controversos. Silva *et al* (1996)⁴², Beltrame *et al.* (2001)⁷, Beltrame *et al* (2002)⁸, Vasconcelos, (2004)⁴⁶ e Lima (2007)³¹ não observaram essa atividade diferentemente de Mori *et al* (2001)³⁵, Barbosa *et al* (2002)⁴, Pepato *et al.* (2003)³⁷, Viana *et al* (2004)⁴⁸ e Miura *et al* (2006)³⁴.

A *Cissus sicyoides* é planta bastante utilizada pela população diabética^{5,20} principalmente como co-adjuvante no tratamento dessa patologia. Sendo assim, buscou-se efeito antidiabetogênico da mesma. Embora se tenha detectado alguma tendência à diminuição da glicose, esse efeito não foi estatisticamente significativo.

Vários fatores interferem num estudo clínico, como a dieta, a amostragem, o estresse diário, a variabilidade individual dos pacientes, a dificuldade em se utilizar placebo com chás (forma mais utilizada pelos pacientes), pois os chás têm, em geral, sabor próprio, afetando, assim, estudo cego. Um fator importante pode ser a interferência de medicamentos. Observou-se nesse estudo, que 50% do GD estavam em uso de medicação antihipertensiva como Propranolol e Hidroclorotiazida. Esses medicamentos, assim como a fenitoína, são conhecidos como diabetogênicos por bloquearem a liberação de insulina, causando hiperglicemia^{29,39}.

A frutossamina, conjunto de proteínas glicosadas no soro, é utilizada para acompanhamento dos pacientes diabéticos tipo 2, pois reflete a glicemia dos últimos 20 dias ou 3 semanas, que é o tempo de vida das proteínas²⁸. A frutossamina liga-se aos grupamentos amina das proteínas, formando uma base de Schiff (aldimina), que, após rearranjo molecular, transforma-se em cetoamina estável denominada de frutossamina³⁸. As pacientes avaliadas estavam com os resultados de frutossamina dentro dos valores de referência.

A ação dos parasitos sobre o hospedeiro é variável dependendo de fatores como o número de formas infectantes presentes, a virulência da cepa, a idade e o estado nutricional do hospedeiro, os órgãos atingidos, a associação de um parasito com outras espécies e o grau da resposta imune ou inflamatória desencadeada. São várias as ações que um parasito pode exercer sobre o infectado como: ação espoliativa, ação tóxica, ação mecânica, ação traumática, ação irritativa, ação enzimática e anóxia³⁶.

Todas as pacientes foram tratadas das parasitoses antes de iniciar o estudo para evitar que esses parasitos interferissem na sintomatologia das reações adversas.

Na avaliação das reações adversas, esse estudo corrobora com o de Vasconcelos (2004)⁴⁶, que, em ensaios toxicológicos clínicos, verificou que, em pacientes normais, o infuso da *Cissus sicyoides* na mesma dose, por 8 semanas, exacerbou a sonolência e a constipação nos mesmos, e que ocorreu discreta diminuição no item tontura.

Nos moldes do estudo realizado, a *Cissus sicyoides* foi bem tolerada pelas voluntárias, não tendo sido evidenciados sinais ou sintomas que impeçam o seu uso pela população.

CONCLUSÕES

No estudo clínico de fase crônica, não foi evidenciado efeito antidiabético significativo nas pacientes intolerantes à glicose ou nas pacientes diabéticas tipo 2. Os dados obtidos desse estudo não são suficientes para corroborar a indicação popular de *Cissus sicyoides* para o tratamento do DM tipo 2. Nas doses utilizadas, a *Cissus sicyoides* não causou alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas gerais e eletrocardiográficas, confirmando a segurança da utilização da mesma, como alimento, pela população. Esse estudo

poderá servir de subsídio para futuras pesquisas farmacológicas clínicas utilizando-se maior número de pacientes com maior cronicidade da doença ou com maior longevidade de tratamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba/FAPESQ por ter viabilizado recursos para a realização desse estudo.

REFERÊNCIAS

1. ADA. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, n. 26, p. 3160-3167, 2003.
2. ASBCROFT, F. M. Mechanisms of the glycemic effects of sulfonylureas. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, p. 456-463, 1996.
3. ATUALIZAÇÃO BRASILEIRA SOBRE DIABETES/SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. 140 p.
4. BARBOSA, W. L. R.; DOS SANTOS, W. R. A.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. Flavonóides de *cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, supl. p. 13-15, 2002.
5. BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central and North América with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n. 4, p. 392-413, 2005.
6. BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva, v. 81, n. 1, p. 19 -27, 2003.
7. BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético da *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova*, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.
8. BELTRAME, F. L.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; DIAS FILHO, B. P.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.
9. BRAGANÇA, L. A. R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói - Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Fluminense, 1996. 300 p.
10. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DECRETO nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006
11. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plantas medicinais & orientações gerais para o cultivo. Brasília: MAPA/SDC, 2006. 48 p.
12. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe de Atenção Básica. Diabetes, n. 6. Ano II. Fev. 2001.
13. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relato de situação: Paraíba. 2. ed. Brasília, DF, 2006.
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA MS/GM Nº971 DE 03 DE MAIO DE 2006. Aprova a POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE – SUS, 2006.
15. BRASIL. Resolução RDC Nº 18, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 1999.
16. BRASIL. Resolução Nº196, de 10 de outubro de 1996. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, 1996, 24 p.
17. BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº251, de 07 de agosto de 1997. Aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a

- área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, 1997, 5 p.
18. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Ensaio Clínico: Princípios e Práticas. Oliveira, G. G. e colaboradores. 1.ed. 2006. 328 p.
 19. CAMPELO, P. M. S. Plantas medicinais e seus extratos: a necessidade de estudos continuados. *Estudos de Biologia*, v. 28 n. 62, 2006.
 20. CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 86, n. 1, p. 11-16, 2005.
 21. CONSENSO BRASILEIRO SOBRE O DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: SBD, 2003. 75 p.
 22. DIB, S. A.; CALLIARI, L. E. P. Diabetes Melito Tipo 1. In: CORONHO V. et al. *Tratado de Endocrinologia e Cirurgia Endócrina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 928-932, 2001.
 23. ELLINGER, V. C. M.; CARLINI, L. T.; MOREIRA, R. O.; MEIRELLES, R. M. R. Relation Between Insulin Resistance and Hematological Parameters in a Brazilian Sample. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n.1, p. 114-117, 2006.
 24. FID/FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. *El Diabetes Atlas*. 2. ed. 2003. 56 p.
 25. GARCIA, X.; CARTAS-HEREDIA, L.; LORENZANA-JIMENEZ, M.; GIJÓN, E. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. *General Pharmacology*, v. 29, n. 3, p. 457-462, 1997.
 26. GOLDFINE, A. B. Beyond the scale: understanding mechanisms of weight gain and obesity in diabetes. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, v. 12, p. 143-145, 2005.
 27. GOLDFINE, A. B. Diabetes and cardiovascular disease: does sugar matter? *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, v. 13, p. 99-102, 2006.
 28. GORINA, A. B. A Clínica e o Laboratório. Ed. Medsi. 16. ed. 1996. 556 p.
 29. HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19. ed. Rio de Janeiro: Ed. Manole, 1999. 1552 p.
 30. HERNANDEZ-GALICIA, E.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; AGUILAR- SANTA-MARIA, L.; ROMAN-RAMOS, R.; CHAVEZ-MIRANDA, A. A.; GARCIA-VEGA, L. M.; FLORES-SAENZ, J. L.; ALARCON-AGUILAR, F.J. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, v. 45, p. 118-124, 2002.
 31. LIMA, C. M. B. L. Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, 2007. 108 p.
 32. LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PEREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco-ubi). *Revista Cubana de Farmácia*, v. 34, n. 2, p. 120-124, 2000.
 33. LORENZI, H. & ABREU MATOS, F. J. Plantas medicinais do Brasil. Nativas e exóticas. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA, 2002. 512 p.
 34. MIURA, T.; SHINDOU, C.; ZHANG, W.; SUZUKI, I.; ISHIDA, T. Antidiabetic activity of *Cissus sicyoides* in KK-A_Y mice. *Journal of Traditional Medicine*, v. 23, n. 3, 89-91, 2006.
 35. MORI, T.; NISHIKAWA, Y.; TAKATA, Y.; KASHIUCHI, N.; ISHIHARA, N. Effect of insulina leaf extract on development of diabetes: comparison between normal, streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v. 54, n. 4, p. 197-203, 2001.
 36. NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 428 p.
 37. PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUTT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 37, p. 15-20, 2003.
 38. PEREIRA, J. V. *Bioquímica Clínica*. João Pessoa: Ed. Universitária/UFPB, 1998. 406 p.
 39. RAVEL, R. Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. 6. ed. 1997. 616 p.
 40. ROSA, R. S. Diabetes Mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999 -2001. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina: Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 164 p.
 41. SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J.; VASCONCELOS, T. H. C.; RAMALHO, J. A. Avaliação da ação hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em pacientes intolerantes à glicose. Trabalho apresentado na modalidade PAINEL durante o I Encontro de Pós-Graduação de Centro de Ciências de Saúde/UFPB, realizado no período de 29/11 a 01/12/2006.
 42. SILVA, G. A.; AKISUE, G.; OGA, S. Ensaio Farmacológico de Ação Hipoglicemiante dos Extratos Fluidos de *Cissus sicyoides* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 5, n. 2, p. 144 -155, 1996.
 43. SOCIEDADE BRASILEIRA de DIABETES. Diretrizes: Tratamento e Acompanhamento do Diabetes mellitus. Rio de Janeiro: Diagraphic ed., 2006. 153 p.
 44. TAMBASCIA, M. A. Diabete melito tipo 2: Conceitos diagnósticos e terapêuticos. *Revista da Hoechst Marion Roussel*, v.1, p. 22, 1997.
 45. VASCONCELOS, T. H. C.; DINIZ, M. F. F. M.; CEZARINO, E. L.; MEDEIROS, I. A.; LIMA, I. M. D. B.; GADELHA, N. R. A. Ensaio toxicológico clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Anais. X Encontro de Iniciação Científica da UFPB, Ciências da Vida, Pró-reitoria de Pós graduação e Pesquisa- João Pessoa: ed. Universitária*, p 99, 2002.
 46. VASCONCELOS, T. H. C. Ensaio toxicológico pré-clínico e clínico com as folhas da *Cissus sicyoides* L. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, 2004. 178 p.
 47. VERONELL, A.; LANERI, M.; RANIERI, R.; KOPRIVEC, D.; VARDARO, D.; PAGANELLI, M.; FOLLI, F.; PONTIROLI, A. E. White blood cells in obesity and diabetes. *Diabetes Care*, v. 27, n. 10, p. 2501 - 2502, 2004.
 48. VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.. Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology*, v. 4, n. 9, 2004.
 49. WANG, J.; ARMOUR, T.; GEISS, L. S.; ENGELGAU, M. M. Obesity and diabetes: dual epidemics on the rise. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, v. 12, p. 174-180, 2005.
 50. ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: ed. Atheneu, 2004. 1081p.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Hosana Bandeira Santos.
 Rua Silvino Chaves nº 1345
 Bairro: Manaíra. João Pessoa/PB
 CEP: 58038-421
 Fone: (83) 32463834/99834644
 Email: hosanabsantos@hotmail.com

Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim – SC*

Gestational diabetes prevalence in São Joaquim – SC, Brazil

Marcelo Luís Schmitt¹, Sérgio Luiz Ribeiro², Marco Antônio Siqueira Paes¹ & Ricardo de Moraes Ribeiro³

RESUMO - O aumento da morbidade e mortalidade perinatal que acompanha a associação diabetes e gestação leva à caracterização de uma classe clínica que inclui as pacientes grávidas, onde o diagnóstico de diabetes ou intolerância à glicose ocorre durante a gestação. As modificações hormonais que ocorrem durante a gravidez criam condições favoráveis à diminuição da tolerância à glicose. Utilizou-se 482 pacientes entre 14 e 43 anos de idade que procuraram o serviço de saúde, no período de junho de 1996 e junho de 1999, para a realização do pré – natal. As pacientes foram submetidas ao teste simplificado de tolerância à glicose e sempre que o valor foi superior a 125 mg/dl, as pacientes realizaram a prova clássica de tolerância à glicose. Das 482 dosagens do teste simplificado de tolerância à glicose, observou-se 32 (6,64 %) com valores superiores a 125 mg/dl e 450 (93,36 %) com valores de glicemia inferiores a 125 mg/dl. Das 32 pacientes submetidas a prova clássica de tolerância à glicose, em 27 os resultados obtidos caracterizaram o diabetes gestacional. Dentre as pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional observou-se 12 (44,44 %) com idade inferior a 25 anos e 15 pacientes (55,56 %) com idade igual ou superior a 25 anos idade.

PALAVRAS-CHAVE - Diabetes gestacional; Glicemia; Teste de tolerância à glicose.

SUMMARY - The increase of the morbidity and mortality perinatal that follow the association of diabetes and gestation takes to the characterisation of a clinical class that include the pregnant patients, where the diagnostic of diabetes or glucose intolerance happens during the gestation. The hormonal changes that occur during gestation create propitious conditions to lower glucose tolerance. Were taken 482 patients between 14 and 43 years old who attend the health service during June 1996 and July 1999. The patients were submitted to the 50-grama oral glucose tolerance test and when the results were over than 125 mg/dl, the 100-gram oral glucose tolerance test (OGTT) was applied. From the 482 analysis of the 50-grama oral glucose tolerance test, 32 (6,64 %) were found with rates of 125 mg/dl or higher and 450 (93,36 %) with glucose rates under 125 mg/dl. For those 32 patients submitted to a OGTT, 27 (5,60 %) had results that have been characterized as gestational diabetes. Among the patients with diagnosis of gestational diabetes where observed 12 (44,44 %) aged bellow 25 years old and 15 (55,56 %) aged 25 or older.

KEYWORDS - Gestational diabetes; Glucose; Glucose tolerance test.

INTRODUÇÃO

O aumento da morbidade e mortalidade perinatal que acompanha a associação diabetes e gestação leva à caracterização de uma classe clínica que inclui as pacientes grávidas, nas quais o diagnóstico de diabetes ou de intolerância à glicose ocorre durante o período gestacional. Assim as pacientes diabéticas que ficam grávidas não estão incluídas nesta classe clínica. As modificações hormonais que ocorrem durante a gravidez criam condições favoráveis à diminuição da tolerância à glicose. Os hormônios, produzidos pela placenta como o estrogênio, progesterona e a gonadotropina cariótica possuem a capacidade de bloquear o efeito da insulina; este efeito de “contra-insulina” geralmente se instala entre a 20^a e 24^a semana de gestação. Com o avanço da gestação a produção hormonal da placenta se amplia e pode iniciar a resistência a insulina. Em muitas mulheres o pâncreas consegue produzir uma quantidade adicional de insulina compensando o efeito resistente. Quando, o pâncreas atinge o máximo de sua produção de insulina e esta quantidade continua sendo insuficiente para reverter os efeitos dos hormônios placentários, resulta o diabetes gestacional. Existem evidências que todas as complicações perinatais são decorrentes da elevação dos níveis maternos de glicemia (Oh, 1979). Pelo período de gestação em que geralmente o diabetes se instala, os riscos de má formação

fetal estão descartados, tendo como principais alterações fetais a macrossomia, pelo consumo excessivo de glicose durante a gestação, resultante dos níveis elevados de glicose que o feto recebe da mãe, e a hipoglicemia pós natal, justificada pela produção aumentada de insulina pelo feto como maneira de compensar a quantidade elevada de glicose que estava sendo utilizada em sua formação. Após o nascimento, com a modificação da alimentação a quantidade de glicose disponível é reduzida, contudo a produção de insulina pelo feto continua nos mesmos níveis, resultando a hipoglicemia. Tem sido relatado, também que crianças filhas de mães com diabetes gestacional não tratado possuem descompensações nos níveis de cálcio e magnésio. Contudo estas alterações são passíveis de tratamento, sendo necessário o correto diagnóstico do diabetes gestacional. Medidas terapêuticas rigorosas, durante a gestação, que possibilitem um bom controle metabólico tem mostrado ser importante na redução das complicações maternas e também da morbidade e mortalidade fetal (Karlsom & Kjellmer, 1972; Gabble e cols., 1977; Aerts e cols., 1990). Vários fatores associados são relacionados com o maior risco de desenvolver o diabetes gestacional, entre eles a obesidade, histórico familiar de diabetes e mulheres com idade superior a 25 anos parecem estar mais sujeitas ao desenvolvimento do diabetes gestacional. Após a gravidez as mulheres devem ser reavaliadas quanto à tolerância à glicose. Na maioria dos casos, há um retorno à normali-

Recebido em 27/11/2007

Aprovado em 16/01/2009

²Médico Ginecologista e Obstetra

³Acadêmico de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina - Unisul

¹Farmacêuticos Bioquímicos do Laboratório BIODIAGNÓSTICO LTDA.

dade, permanecendo apenas o risco de desenvolvimento futuro do diabetes baseado nesta anormalidade prévia.

O procedimento diagnóstico mais utilizado para detecção do diabetes gestacional é a realização do teste de tolerância à glicose (curva glicêmica), como proposto por O'Sullivan e Mahan (1964) e recomendado pelo National Diabetes Data Group (NDDG - 1979). Entretanto, dificuldades práticas que se verificam para a realização deste teste em todas as gestantes, levaram alguns autores a propor testes simplificados para o rastreamento do diabetes nestas situações, envolvendo a análise de uma única medida de glicemia, feita uma hora após a ingestão de 50 gramas de glicose (o valor crítico desta determinação tem sido estabelecido em 125 mg/dl), para só depois submeterem as pacientes ao teste de tolerância à glicose.

Neste trabalho avaliou-se a prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim- SC, a partir do rastreamento com o teste simplificado de diagnóstico, pela análise de glicemia após a ingestão de 50 g de glicose e a confirmação diagnóstica pela prova clássica de tolerância à glicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e testes:

Foram utilizados 482 pacientes entre 14 e 43 anos de idade que realizaram os exames pré-natais no Laboratório Biodiagnóstico LTDA, no período de junho de 1996 a junho de 1999, para realização de pré-natal. As pacientes foram submetidas ao teste simplificado de tolerância à glicose, e sempre que o valor da glicemia foi igual ou superior a 125 mg/dl, as pacientes foram submetidas a prova clássica de tolerância à glicose (curva glicêmica).

Orientações pré-teste:

Antes do teste as pacientes foram orientadas a manter uma dieta contendo no mínimo 150 g / dia de carboidratos nos 3 dias que antecedem o teste. Realizarem um período de jejum não inferior a 10 horas e não superior a 16 horas (ideal 12 horas), não fumarem e permanecerem sentadas durante a realização dos testes. Além disto, os resultados de pacientes que estavam utilizando medicação que comprovadamente interferem "in vivo" ou "in vitro" na determinação de glicemia e/ou glicosúria não foram considerados.

Teste simplificado de tolerância à glicose:

Para realização do teste, foi ofertado as pacientes 50 gramas de glicose anidra (Biotec) dissolvidas em 250 a 300 ml de água, com ingestão em no máximo 5 minutos. Após 1 hora, foi coletado de 3 a 5 ml de sangue em frasco contendo 1 gota de anticoagulante fluoreto de sódio (Glistab-Labtest), em seguida o sangue foi centrifugado por 5 minutos à 2500 R.P.M. e o plasma separado do restante do material. As dosagens de glicemia foram realizadas pela técnica de Glicose - Oxidase (Biodiagnóstica) no máximo até às 11:00 horas do mesmo dia, concomitantemente foi realizada dosagem de soro controle fornecido pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, estando os resultados em concordância com os programas de controle de qualidade interno e externo (PNCQ No 00686).

Prova clássica de tolerância à glicose (curva glicêmica):

Esta prova consiste em ofertar 100 gramas de glicose anidra as pacientes, com as mesmas orientações e os mesmos procedimentos técnicos de coleta e análise do teste simplificado de tolerância à glicose, como descritos acima, variando a frequência das coletas de sangue (0, 30, 60, 90

e 120 minutos) acompanhados de coleta de urina que, após coletas permaneceram em geladeira até 30 minutos antes da determinação de glicosúria pelo método de Benedict. As curvas glicêmicas foram analisadas segundo critério do NDDG, para a confirmação do diabetes gestacional.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

1. Teste simplificado de tolerância à glicose: Os resultados foram divididos em 2 grupos:

A: Glicemia até 125 mg/dl;

B: Glicemia superior a 125 mg/dl

2. Prova clássica de tolerância à glicose: Os resultados foram divididos em 2 grupos:

A: Diagnóstico de diabetes gestacional;

B: Não diagnóstico de diabetes gestacional.

3. Relevância da idade na prevalência de diabetes gestacional: Os resultados foram divididos em 2 grupos:

A: Idade até 25 anos;

B: Idade igual ou superior a 25 anos.

RESULTADOS

Das 482 dosagens do teste simplificado de tolerância à glicose, observou-se 32 (6.64 %) com valores superiores a 125 mg/dl e 450 (93.36 %) com valores de glicemia abaixo de 125 mg/dl

TABELA I

Triagem de diabetes gestacional pelo teste simplificado de tolerância à glicose no município de São Joaquim - SC

Glicemia	Número Absoluto	Percentual (%)
Até 125 mg/dl	450	93.36
Superior a 125 mg/dl	32	6.64
Total	482	100.00

Valores de glicemia referem-se a dosagem 1 hora após a ingestão de 50 grs. de Glicose

Estas 32 pacientes foram submetidas a prova clássica de tolerância à glicose, e observou-se 27, com resultados de glicemia em conformidade com os critérios do NNDG, sendo diagnosticado o diabetes gestacional.

TABELA II

Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim - SC, diagnosticado pela prova clássica de tolerância à glicose, após triagem pelo teste simplificado de tolerância à glicose.

Prova clássica de tolerância	Número Absoluto	Percentual (%)
Não diabetes gestacional	455	94.40
Diabetes Gestacional	27	5.60
Total	482	100.00

Nas pacientes em que foi diagnosticado o diabetes gestacional avaliamos se o fator idade poderia ser relevante na prevalência do diabetes gestacional, observamos 12 pacientes (44.44 %) com idade inferior a 25 anos e 15 pacientes (55.56 %) com idade igual ou superior a 25 anos de idade, demonstrando que o fator idade, isoladamente, não pode ser considerado como risco aumentado de desenvolvimento do diabetes gestacional, nestas condições experimentais.

TABELA III
Idade como fator relevante na prevalência do diabetes gestacional no município de São Joaquim – SC

Idade	Número Absoluto	Percentual (%)
Até 25 anos	12	44.44
25 ou mais anos	15	55.56
Total	27	100.00

Não foi observada significância estatística entre os grupos

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que a prevalência de diabetes gestacional, no município de São Joaquim – SC, foi de 5.60 % está acima da média de 2 a 5 % observada no Brasil pelo Ministério da Saúde. Estes resultados reforçam a necessidade de estrito acompanhamento das gestantes no intuito de diagnosticar o diabetes gestacional minimizando os efeitos danosos ao feto, como a macrosomia, a hipoglicemia neo-natal, além das descompensações nos níveis séricos de cálcio e magnésio. As complicações decorrentes do diabetes gestacional são controláveis e podem ser prevenidas, sendo o ponto fundamental o controle eficiente dos níveis de glicemia da gestante, após o diagnóstico do diabetes gestacional. Para que o diagnóstico do diabetes gestacional seja realizado é fundamental o acompanhamento das gestantes com a realização periódica de exames pré – natais, segundo orientações médicas individuais. Nas pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional, a orientação sobre o correto monitoramento dos níveis séricos de glicemia, exercícios físicos e necessidade de administração de insulina exógena deve ser tratado como ponto fundamental para a efetiva redução dos danos ao feto. Outro fator que deve receber especial atenção na gestante diabética é o esclarecimento sobre pontos que geralmente estes pacientes desconhecem e preocupam-se fortemente, como: O bebê terá problemas de saúde em virtude do diabetes da mãe?; Qual a dieta recomendada?; Quem apresenta diabetes gestacional será sempre diabética? Meu Filho nascerá com diabetes?; Poderei desenvolver diabetes no futuro? Nas pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional é fundamental a orientação e acompanhamento, em virtude da perspectiva de risco aumentado de desenvolvimento futuro de diabetes, baseado nesta anormalidade prévia. Estes dados são úteis ainda para o planejamento de ações de saúde na esfera municipal, visando a identificação e acompanhamento das gestantes, na que tange ao diabetes gestacional.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Secretaria Municipal de Saúde de São Joaquim, pelo apoio em nosso trabalho e ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, CCF - UFSC pelas orientações no desenvolvimento deste trabalho.

MEDICAMENTOS QUE PODEM INTERFERIR NA TOLERÂNCIA À GLICOSE

Diuréticos e anti-hipertensivos:

Clortalidona, furosemida, tiazídicos, diazóxido, metolozona, propranolol, bumetamida, ácido etacrínico, clonidina, bloqueadores de cálcio.

Hormônios:

Corticóides, acth, glucagon, contraceptivos orais, hormônios tireoidianos (em doses tioróticas).

Agentes psicoativos:

Haloperidol, carbonato de lítio, antidepressivos tricíclicos (amitripilina, desipramina, doxepina, imipramina, nortripilina), fenotiazidas, marijuana.

Catecolaminas e outros agentes neurologicamente ativos:

Fenitoína, epinefrina, isoproterenol, levodopa, norepinefrina.

Agentes antineoplásicos:

Aloxane, estreptozotocina, L-asparaginase, ciclofosfamida.

Outros:

Indometacina, ácido nicotínico, acetaminofeno, morfina, cimetidina, encainida, pentamidina.

REFERÊNCIAS

1. Aerts L., Holemans k. & Van Assche F.A. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes and Metabolism Review*, 6: 147 - 157.
2. Gabbe S.G., Jéquier E., Chabot U., Buber V. & Felber J.P. (1977). Management and out come of class a diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 127: 465 - 469.
3. <http://www.nih.gov/health/chip/nichd/ugd/>
4. Karlsson K. & Kjellmer I.C. (1972). The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 112: 213 - 220.
5. National Diabetes Data Group (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28: 1039 - 1057.
6. Oh W. (1979). Neonatal care and long - term outcome in infants of diabetic mothers. In: Merkatz I.R. & Adam P.A.J. (editors), *The Diabetic Pregnancy, A perinatal Perspective*. Grune & Stratton, New York, 195 - 205.
7. O'Sullivan J.B. & Mahan C.M. (1964). Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes*, 13: 278 - 285.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Farmacêuticos Bioquímicos do Laboratório Biotecnológico LTDA.
 Rua Maj. Jacinto Goulart, 115 São Joaquim –SC CEP. 88.600-000
 biotecnologico@oul.com.br

CPG - SBAC

Centro de Pós-Graduação da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

www.sbac.org.br

cursos@sbac.org.br

(21)2187-0800

Inscrições
 Abertas

PRÊMIO PNCQ

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio PNCQ é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio do Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio PNCQ" tem por objetivos:

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Controle de Qualidade no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho sobre controle de qualidade inscrito e apresentado na sessão de Temas Livres dos CBAC, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e keywords (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio PNCQ, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio PNCQ, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio PNCQ é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio PNCQ obrigatoriamente, deve ser apresentado em sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio PNCQ

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Comparação entre a contagem manual e automatizada de células no líquido cefalorraquidiano

Comparison between the count manual and automatized of cells in cerebrospinal fluid

Andrei Gustavo Bonavigo, Vanessa Gelinski, Gislaïne Franco de Moura Costa, Jacqueline Plewka & Marco Antônio Costa

RESUMO - Atualmente, a análise citológica deste líquido é feita de forma manual, utilizando a câmara de Fuchs-Rosenthal, o que torna o exame demorado e com grande possibilidade de erros. Entretanto, outras análises citológicas podem ser realizadas através de contadores automáticos, garantindo uma análise mais rápida e confiável. O objetivo do trabalho é a comparação entre a contagem manual e automatizada de células no LCR, para verificação da possibilidade de ser realizada na automação. Para tanto, foram analisadas 100 amostras de LCR, sendo que 50 amostras foram analisadas no contador hematológico Pentra® 60 (ABX) e 50 amostras analisadas no contador hematológico CellDyn® 3200, em comparação com a contagem manual de referência. Os resultados demonstraram que 62 amostras não reproduziram adequadamente os dados na contagem automatizada, o que nos leva a imaginar que o LCR não deve ser analisado em automação. Assim, é importante a realização de novos trabalhos, com números maiores de amostras e aparelhos para definirmos a possibilidade do uso da automação na contagem citológica de LCR.

PALAVRAS-CHAVE - Análise citológica, líquido cefalorraquidiano, contadores hematológicos.

SUMMARY - Currently, the cytological examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is carried out manually, using the camera to Fuchs-Rosenthal, which makes the examination time and with great possibility of mistakes. Meanwhile, other cytological tests can be performed through automatic counters, ensuring a more rapid and reliable analysis. The goal of the work is a comparison between manual and automated counting of cells in CSF, to verify the possibility of being held in automation. For both, were analyzed 100 samples of CSF, and that 50 samples were analyzed in blood meter Pentra® 60 (ABX) and 50 samples analyzed in blood meter CellDyn® 3200, as compared to the manual counting of reference. The results showed that 62 samples do not adequately reproduced the data in the automated counting, which leads us to imagine that the CRL should not be considered in automation. Thus it is important to hold further work, with larger numbers of samples and equipment to determine the possibility of the use of automation in the counting of cytological CRL.

KEYWORDS - Cytological analysis, cerebrospinal fluid, blood counters.

INTRODUÇÃO

Alguns dos mais importantes exames realizados na rotina laboratorial envolvem os líquidos biológicos produzidos pelo nosso organismo, entre eles, destacam-se o líquido cefalorraquidiano, pleural, peritoneal e pericárdico (13).

Descoberto em 1764, por Cotugno, o Líquido Cefalorraquidiano (LCR) é o terceiro principal fluido biológico do organismo. Cerca de 70% do LCR, contido nas cavidades ventriculares do sistema nervoso central (SNC), espaços subaracnóides, espinhal, perivascular, perineurais e no canal central da medula, origina-se nos plexos coróides ventriculares por processos combinados de secreção ativa e ultrafiltração do plasma, e o restante é formado como líquido intersticial, elaborado dentro dos espaços intercelulares do cérebro e medula espinhal (10, 13).

O LCR desempenha funções muito específicas e fundamentais no organismo. Auxilia na proteção contra traumatismos e movimentos bruscos, lubrifica, isolando os grandes órgãos nervosos, nutri estabelecendo trocas de várias substâncias com o sangue e serve como veículo para secreções da hipófise. Pode ser obtido através de punção lombar, punção cisternal, punção cervical lateral ou através de cânulas ventriculares. As indicações para uma punção lombar podem ser divididas em quatro categorias principais de doenças, como infecção meningea, hemorragia subaracnóide, processos malignos do SNC e doenças desmielinizantes (4, 6).

O exame do LCR fornece informações importantes em

relação ao diagnóstico etiológico e ao acompanhamento de processos inflamatórios, infecciosos ou neoplásicos dos órgãos que são envolvidos por esse líquido. Esse exame compreende a análise dos aspectos físicos, bioquímicos e citológicos do LCR (2).

Atualmente, a análise citológica é feita de forma manual, utilizando-se a câmara de Fuchs-Rosenthal. Essa análise constitui um problema nos diagnósticos de emergência, visto que, o exame de LCR é de urgência e auxilia no fechamento do diagnóstico clínico. Com isso, o exame torna-se demorado e com grande possibilidade de erros, devido à falta de atenção ou prática do analisador.

Outras análises citológicas, contudo, podem ser realizadas facilmente através de contadores automáticos de células, por exemplo, na análise de amostras de sangue e urina, garantindo uma análise mais rápida e confiável (1, 16). A inclusão de métodos automatizados na rotina laboratorial tem contribuído significativamente auxiliando aos médicos na decisão diagnóstica rápida e precisa. O efeito da automação garante resultados mais confiáveis, com melhor organização e manipulação das amostras, melhor acurácia no levantamento de dados, além de otimizar tempo, recursos humanos, espaço e material, enfocando o custo benefício (5, 7).

Os contadores hematológicos são muito comuns nos laboratórios de análises clínicas, pela sua praticidade durante a rotina laboratorial. Esses equipamentos realizam a contagem celular através de diferentes métodos e princípios. O contador hematológico Pentra® 60 (ABX) realiza a contagem das

Recebido em 18/12/2007

Aprovado em 03/11/2008

Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Univ. do Oeste do Paraná
Av. Presidente Tancredo Neves, 3224, Cascavel - PR

células pelo método de impedância elétrica, que consiste na contagem dos pulsos de condutividade causados pelas células ao cruzarem um orifício pelo qual flui uma corrente elétrica. Já o contador hematológico CellDyn® 3200, usa a técnica de citometria de fluxo para analisar as populações de leucócitos e hemácias. Assim, as células são passadas através de um feixe de luz e um sensor mede, por meio da perda ou dispersão da luz, a quantidade de células presentes (4, 8, 9). O objetivo deste estudo é, valendo-se de métodos automatizados, verificar a fidelidade dos resultados obtidos quando comparados ao método de contagem manual de referência.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras provenientes de pacientes adultos e crianças atendidos nos postos de saúde (SUS) de Foz do Iguaçu/PR, e pacientes atendidos no Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP) de Cascavel/PR. Os materiais biológicos, após serem analisados na rotina laboratorial dos laboratórios LABORFOZ e Laboratório de Análises Clínicas do HUOP, foram utilizados para a realização desse trabalho.

A coleta das amostras foi realizada por punção lombar, em frascos estéreis, e conduzidas imediatamente ao laboratório. Quando as análises não puderam ser realizadas imediatamente, as amostras foram armazenadas em geladeira em temperatura de 2 a 8°C, e posteriormente analisadas.

Todas as amostras passaram pelas análises físicas, químicas e citológicas de acordo com a padronização da literatura, considerando-se como valores normais de referência para a citologia até 10 leucócitos/mm³ e ausência de hemácias (11). Utilizou-se essa padronização para todas as amostras porque muitas delas não apresentavam informações referentes ao sexo e idade dos pacientes.

As contagens celulares foram realizadas de forma manual, com o LCR não diluído, na câmara de Fuchs – Rosenthal, e após, submetidas à análise nos contadores hematológicos Pentra® 60 (ABX) fabricante ABX diagnostics, 1999 e CellDyn® 3200 fabricante Abott Laboratories, 1997, para comparação.

Foram analisadas 100 amostras de LCR durante o período de Janeiro de 2006 a Agosto de 2007, sendo que 50 amostras foram analisadas no contador hematológico Pentra® 60 (ABX) e 50 amostras analisadas no contador hematológico CellDyn® 3200. Após a análise, os dados foram tabulados e analisados comparativamente para o desenvolvimento das hipóteses prováveis.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética e Biossegurança da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESULTADOS

Em nosso trabalho das 100 amostras analisadas foram encontradas 27 amostras (27% do total) que apresentaram contagem manual de células dentro da normalidade, mas não apresentaram contagem quando analisadas na automação. Apenas 2 amostras (2% do total) mostraram contagem de leucócitos alterada quando comparada com a contagem manual. As tabelas 1 e 2 fornecem os valores encontrados na contagem manual e automatizada de LCR com contagem de células dentro do limite de referência.

TABELA I
Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador Pentra® 60 (ABX), em LCR normais

Contagem Manual		Contagem Automatizada (Pentra® 60 ABX)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
1	0	0	0
2	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
1	0	0	0
0,6	0	0	0
10	0	0	0
7	0	0	0
1	0	0	0
5	0	100	0
1	0	100	0

TABELA II
Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador CellDyn® 3200, em LCR normais

Contagem Manual		Contagem Automatizada (CellDyn® 3200)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
0,6	0	0	0
0,6	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0,3	0	0	0
0,6	0	0	0
0,3	0	0	0
8	0	0	0

Um número grande de amostras (53 amostras – 53% do total), com contagem alterada de células, não mostrou concordância quando analisadas na automação, ou seja, tanto leucócitos quanto hemácias foram detectados na contagem manual, mas não na contagem automatizada (Tabelas 3 e 4).

TABELA III
Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador Pentra® 60 (ABX), em LCR com contagem alterada de células, detectada somente pelo método manual

Contagem Manual		Contagem Automatizada (Pentra® 60 ABX)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
105	10	0	0
30	460	0	0
52	280	0	0
4000	0	0	0
60	0	0	0
1	100	0	0
25	100	0	0
1	605	0	0
2,8	1,55	0	0
1	2	0	0
1	3	0	0
80	0	0	0
5	71	0	0
30	0	0	0
1	5	0	0

TABELA IV

Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador CellDYN® 3200, em LCR com contagem alterada de células, detectada somente pelo método manual

Contagem Manual		Contagem Automatizada (CellDYN® 3200)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
0	1,6	0	0
2,6	3,3	0	0
3	1,3	0	0
1,3	0,3	0	0
1,3	0,3	0	0
6	1,6	0	0
2	0,3	0	0
4,3	1,3	0	0
9	1,6	0	0
2,3	0,3	0	0
1,6	3	0	0
1,6	3,6	0	0
84,3	4	0	0
3,6	2	0	0
3,3	2	0	0
Incontáveis	0	0	0
1	3,3	0	0
3,6	8,3	0	0
1	0,3	0	0
27,3	Incontáveis	0	0
0	0,3	0	0
6	2,3	0	0
1	1	0	0
1,3	0,6	0	0
1,3	0,6	0	0
1,3	720	0	0
22,6	725,3	0	0
1,6	277,3	0	0
1	0,3	0	0
3	0,3	0	0
1,3	2,3	0	0
1	1	0	0
3,6	1,6	0	0
1,3	1,3	0	0
2,6	9,3	0	0
0,6	0,3	0	0
2	1,3	0	0
3	0,3	0	0

Na análise de 7 amostras (7% do total), a contagem automatizada detectou a presença de um ou outro elemento celular, falhando principalmente, na detecção de hemácias (Tabela 5 e Gráfico 1). Neste caso, as amostras com esses resultados eram provenientes somente da contagem no contador hematológico Pentra® 60 (ABX).

TABELA V

Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador Pentra® 60 (ABX), em LCR alterados detectada pelo método manual, mas nem sempre pelo método automatizado

Contagem Manual		Contagem Automatizada (Pentra® 60 ABX)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
17	35000	0	60000
65	85	100	0
235	165	300	0
170	240	300	0
3670	85	350000	0
505	2	700	0
30	12	200	0

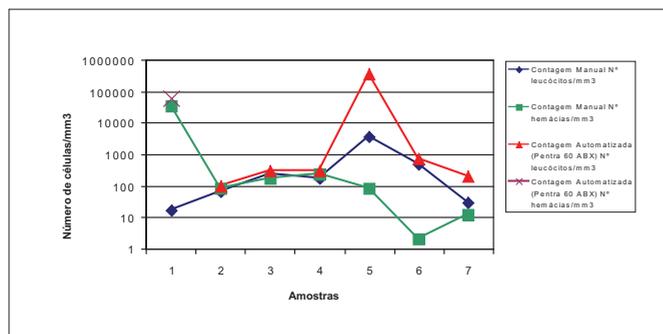


Gráfico 1: Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador hematológico Pentra® 60 (ABX), em LCR alterados, detectada pelo método manual, mas nem sempre pelo método automatizado (escala logarítmica).

Somente 13 amostras (13% do total) mostraram concordância na contagem automatizada, revelando pelos dois métodos a presença ou ausência dos elementos celulares. Neste caso, as amostras com esses resultados eram provenientes somente da contagem no contador hematológico Pentra® 60 (ABX). Quando o aparelho detectou a presença de elementos celulares, demonstrou contagem maior do que a encontrada na contagem manual (Tabela 6 e Gráfico 2).

TABELA VI

Comparação entre as contagens manual e automatizada de células, utilizando somente o contador Pentra® 60 (ABX), em LCR alterados, detectada pelos dois métodos

Contagem Manual		Contagem Automatizada (Pentra® 60 ABX)	
Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³	Nº leucócitos/mm ³	Nº hemácias/mm ³
2080	12000	3600	40000
25	Incontáveis	100	50000
150	Incontáveis	900	130000
30	0	100	0
125	0	200	0
105	0	200	0
695	0	600	0
365	16000	1400	11300
800	0	1100	0
825	0	1000	0
5360	0	5100	0
2800	160	2800	20000
468	73	771	990

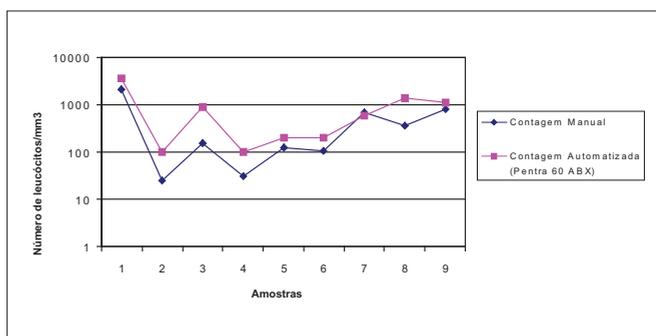


Gráfico 2: Comparação entre as contagens manual e automatizada de leucócitos, utilizando somente o contador hematológico Pentra® 60 (ABX), em LCR alterados, detectada pelos dois métodos (escala logarítmica).

DISCUSSÃO

A contagem manual de células em líquidos biológicos ainda é uma prática comum na maioria dos laboratórios em nosso país, sendo, porém, paulatinamente substituída por contadores automatizados, principalmente nos exames de sangue (hemograma) e urina. Alguns fatores podem justificar este quadro, como a contagem manual, apesar de mais demorada e depender da prática de observação do analista, ser o método mais econômico, ao contrário da automação, a qual nem todos os laboratórios têm poder aquisitivo para implantá-los.

Com o incremento da automação, alguns autores têm comparado a reprodutibilidade dos aparelhos em relação à contagem manual, para observar se realmente os aparelhos podem agilizar a rotina com qualidade e precisão nos resultados (3, 15).

Sendo o exame do líquido cefalorraquidiano, um exame de urgência e extremamente importante para a conclusão diagnóstica de patologias graves envolvendo o encéfalo e a medula, é de suma importância encontrar metodologias práticas que agilizem o exame e aumentem a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados (14). Assim, aparelhos automatizados poderão contribuir muito para a rapidez diagnóstica e conseqüentemente para um tratamento mais

adequado e um melhor prognóstico de recuperação do paciente (12).

Em nosso trabalho, das 100 amostras de LCR analisadas, 27 (27%) apresentaram-se normais pela contagem manual, tanto para a contagem de leucócitos quanto para hemácias. A grande maioria destas amostras não apresentou contagem quando realizadas no aparelho, o que pode ser justificado pelo pequeno número de células, insuficientes para serem captadas pela automação (Tabelas 1 e 2). Contudo, não há interferência no resultado final, pois não alteraria a interpretação dos resultados. Somente duas amostras mostraram contagem de leucócitos alterada quando comparada com a contagem manual (7,4% das amostras normais). Este resultado pode revelar a possibilidade do aparelho apresentar resultado falso-positivo para os leucócitos em comparação com a contagem manual de referência.

Quando comparamos a contagem entre LCR alterados, com número de células aumentadas (73% das amostras), observamos algumas situações especiais.

Um número elevado (53 amostras) não mostrou reprodutibilidade quando analisadas na automação, ou seja, os elementos, tanto leucócitos como hemácias, foram identificados na contagem manual, mas não nos aparelhos (Tabela 3 e 4). Como demonstrado pela tabela 5 e, em outras amostras (7% do total) a contagem automatizada detectou um ou outro elemento, falhando principalmente na detecção das hemácias (gráfico1). Estes resultados são preocupantes, pois mostram falso-negativos, prejudicando a interpretação diagnóstica e conseqüentemente o tratamento.

Entretanto, Ziebig *et al* (2000) realizaram contagens em outros dois tipos de aparelhos e obtiveram resultados semelhantes, indicando que podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Somente 13 amostras mostraram reprodutibilidade na contagem automatizada, revelando pelos dois métodos a presença ou a ausência dos elementos celulares (Tabela 6). Quando o aparelho detectou a presença, mostrou na maioria das comparações, uma contagem maior do que a encontrada na contagem manual (gráfico 2). Isto demonstra que a automação pode ser mais eficiente em revelar a intensidade do processo do que a contagem manual.

Importante destacar que, quando ocorreu a concordância ou a detecção do elemento apontado pela contagem manual, ocorreu no aparelho Pentra® 60 (ABX) que realiza a contagem das células pelo método de impedância elétrica, onde as células são detectadas através da produção de pulsos de condutividade. Já o contador CellDyn® 3200, que usa a técnica de citometria de fluxo, onde as células são analisadas através de um feixe de luz, não ocorreu a detecção das alterações.

Neste sentido, sugerimos que novos trabalhos sejam feitos, com um número maior de amostras e com o uso de outros aparelhos, principalmente que utilizam o método de impedância elétrica, para que possamos ter uma conclusão definitiva. Sugerimos também que outros líquidos biológicos também sejam testados em relação à contagem citológica em automação.

CONCLUSÃO

Assim, nossos resultados demonstraram que 62 amostras (62%) não reproduziram adequadamente os dados na contagem automatizada, o que nos leva a deduzir que o LCR não deva ser contado em aparelhos, mas sim continuar a ser contado em câmara de hemocitômetro. Contudo, a amostragem de nosso trabalho é pequena, sendo impor-

tante, a realização de novos trabalhos, com números maiores de amostras e aparelhos para definirmos a possibilidade do uso de automação para a contagem citológica de líquido cefalorraquidiano.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, ao Hospital Universitário do Oeste do Paraná – Cascavel/PR e ao Laboratório LABORFOZ – Foz do Iguaçu/PR pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. ANDREWS, J.; SETRAN, E.; MCDONNEL, L.; KUSSICK, S.; WOOD B. L. & SABATH D E. - An evolution of the cell-dyn 3200 for counting cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. Lab Hematol (Laboratory hematology: official publication of the International Society for Laboratory Hematology). 11 (2) 98-106, 2005.
2. ANDRIOLO, A. - Medicina Laboratorial. 1ª ed. São Paulo, Editora Manole, p-243 e 244, 2005.
3. AUNE, M. W. & SANDBERG, S. - Automated counting of white and red blood cells in the cerebrospinal fluid. Clin Lab Hematol (Clinical and Laboratory hematology.) 22 (4) p-203-10, 2000.
4. HENRY, J.B. - Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19ª ed. São Paulo, Editora Manole, p-457 a 461, 1999.
5. KISHIDA, N. F. M. & - Modernização em busca da otimização dos serviços em uroanálise. Roche in News, São Paulo, v.57, n.2, p. 5-9, abr./mai.2003.
6. LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, J. R. - Métodos de Laboratório Aplicado a Clínica: Técnica e Interpretação. 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p-20-1 a 20-6, 2001.
7. MACHADO, M. H. T.; GONÇALVES, E.D.; LARGURA, M.A.; GONÇALVES, A; ANDRADE, M.P. & LARGURA, A.. - Automação do exame de urina: comparação do Urisys 2400 com a rotina manual (Microscopia do sedimento urinário). Revista Brasileira de Análises Clínicas. Rio de Janeiro, v.35, n.4, p. 165-167, 2003.
8. Manual de operações CellDyn® 3200, Fabricante Abott Laboratories USA, 1997.
9. Manual Pentra® 60 (ABX diagnostics), France, 1999.
10. MOTTA, V. T. - Bioquímica Clínica: princípios e Interpretações. 4ª ed. Porto Alegre, Editora Alegre Missau p-401 a 403, 2003.
11. MOURA, R. A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. - Técnicas de Laboratório. 3ª ed. São Paulo, Editora Atheneu p-258, 2002.
12. SOOGARUN, S.; SIRIMONGKOLSAKUL, S.; WIWANITKIT, V.; SIRITANTIKORN, A.; PIMSANE, K. & SRIVIJARN, R. - Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer. Technicon H*3. Clin Lab (Clinical Laboratory) 48 (11-12) p-623-9, 2002.
13. STRASINGER, S. K. - Urinalysis and body fluids F. A: Company, Philadelphia, PA , p-32-p-38, 1996.
14. STRIK, H.; LUTHE, H.; NAGEL, I.; EHRlich, B. & BAHR, M. - Automated cerebrospinal fluid cytology: limitations and reasonable applications. Anal Quant Histol (Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology and American Society of Cytology). 27 (3) p-167-73, 2005.
15. WAH, D. T.; WISES, P. K. & BUTCH, A. W. - Analytic performance of the IQ200 urine microscopy analyzer and comparison with manual counts using Fuchs-Rosenthal cell chambers. AM J Clin. Patho. (American Journal of Clinical Pathology).123 (2): 290-6, 2005.
16. ZIEBIG, R.; LUN, A. & SINHÁ, P. - Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer CellDyn 3500 and the urine flow cytometer UF-100. Clin Chem (Clinical Chemistry). 6 (2) :242-7, 2000.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)
Av. Pres. Tancredo Neves, 3224 – Cascavel – Paraná – Brasil
andreibonavigo@hotmail.com, macosta@unioeste.br

Nocardiose disseminada em paciente leucêmico*

Disseminated nocardiosis in leucemic patient

Rossana Sette de Melo Rêgo¹, Norma Suely Sobral da Silveira², Kedma de Magalhães Lima³ & Francisco Montenegro Melo⁴

RESUMO - Portador de leucemia linfóide crônica em uso de imunossupressor desenvolveu nocardiose disseminada. O diagnóstico microbiológico de aspirados de abscesso pulmonar e cutâneos revelou *Nocardia brasiliensis*. Instituído tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim, ocorreu melhora do paciente. Após terapia de manutenção e monitoramento por um ano, não foi observada recorrência da nocardiose.

PALAVRAS-CHAVE - *Nocardia brasiliensis*, Nocardiose, Abscesso pulmonar, Imunossupressor.

SUMMARY - Patient with chronic lymphocytic leukemia using immunossupressor developed disseminated nocardiosis. Examining the aspirated from the abscess was isolated *Nocardia brasiliensis*. After treatment with sulfametoxazol-trimetoprim the patient improved and was discharged from the hospital with no relapse in one year of observation.

KEYWORDS - *Nocardia brasiliensis*, Nocardiosis, Pulmonary abscess, Immunodeficiency.

INTRODUÇÃO

Nocardiose é uma infecção localizada ou disseminada, oportunista, incidindo principalmente em pacientes com depressão da imunidade celular. Em geral, é adquirida por inalação, podendo disseminar-se por via hematogênica a outros órgãos, como sistema nervoso central e pele^{1, 5, 7}.

O envolvimento pulmonar pode ser autolimitado ou subclínico, com formas agudas, subagudas ou crônicas que simulam tuberculose, infecção fúngica invasiva ou neoplasia^{2, 15}. Infecção cutânea primária pode ocorrer por inoculação direta da bactéria após trauma ou cirurgia^{1, 14}.

Os autores relatam um caso de portador de leucemia linfóide crônica em tratamento para a doença de base com clorambucil, que desenvolveu quadro de nocardiose disseminada, após vários episódios de pneumonia, refratários ao tratamento antibacteriano convencional.

RELATO DO CASO

Paciente masculino, de 79 anos, branco, procedente de Recife, Pernambuco, apresentava diagnóstico de leucemia linfóide crônica há dois anos. Foram prescritas seis sessões de pulsoterapia com clorambucil a intervalos de 30 dias. Após a primeira sessão, o paciente foi internado com pneumonia grave e imunodepressão. Oito meses depois, reiniciou a pulsoterapia e desenvolveu novo quadro de pneumonia, sem plena recuperação, continuando com febres cíclicas e perda de peso, mesmo em uso de antibacteriano linezolidina. Ocorreu novo episódio de pneumonia com a mesma localização pulmonar dos anteriores e agravamento do quadro, tendo sido também detectados nódulos em nádega e panturrilha.

O paciente foi submetido à radiografia do tórax (Figura 1) e tomografia computadorizada (Figura 2) que demonstraram abscesso pulmonar comprometendo o segmento lingular inferior. Ao mesmo tempo, foram observados, após exame ultrassonográfico, nódulos flutuantes em nádega esquerda e panturrilha direita. Realizou-se punção aspirativa percutânea do

tórax, guiada por tomografia computadorizada, e drenagem do nódulo da panturrilha e da nádega para exame microbiológico. Os exudatos foram processados para exame direto, utilizando-se as colorações de Gram, Giemsa e Ziehl-Nielsen. As amostras foram semeadas nos meios de Ágar Sangue, Ágar Chocolate, Ágar de Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100mg/l) e Ágar Mycosel®. O exame direto dos exudatos demonstrou a presença de numerosos filamentos bacterianos finos e ramificados (Figura 3). Em Ágar de Sabouraud, ocorreu crescimento de colônias inicialmente brancas, com "odor de terra molhada", que se tornaram alaranjadas e secas (Figura 4) e, à microscopia, foram visualizados filamentos Gram positivos. Após provas bioquímicas, seguindo os critérios adotados por Koneman *et al*⁶, foi identificada *Nocardia brasiliensis*. Iniciou-se sulfametoxazol-trimetoprim, na dose 15mg/kg/dia, com melhora da sintomatologia pulmonar, regressão das alterações radiológicas e das lesões nodulares. O paciente recebeu alta hospitalar, continuou com tratamento de manutenção (10mg/kg/dia) por 6 meses, sendo monitorado por um ano, período no qual não foi observada qualquer evidência de recorrência da nocardiose.

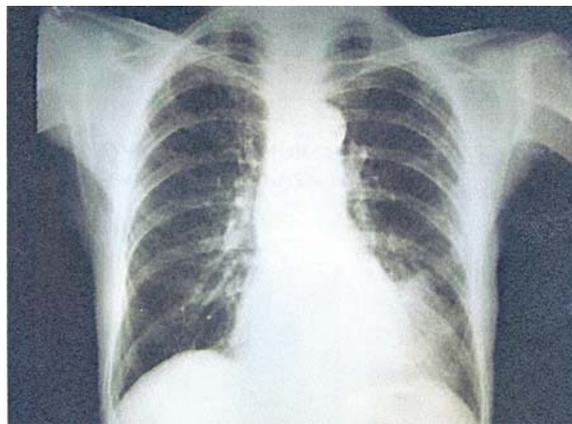


Figura 1 – Radiografia do tórax evidenciando consolidação na área lingular inferior.

Recebido em 01/08/2007

Aprovado em 23/10/2008

*Trabalho realizado no Setor de Micologia do Laboratório NKB Diagnósticos-PE.

¹NKB Diagnósticos-PE,

²Laboratório de Micologia /Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE,

³Departamento de Medicina Tropical/Universidade Federal de Pernambuco – UFPE,

⁴Universidade de Pernambuco – UPE, Recife, PE.



Figura 2 – Tomografia computadorizada do tórax demonstrando a presença de opacidade consolidativa

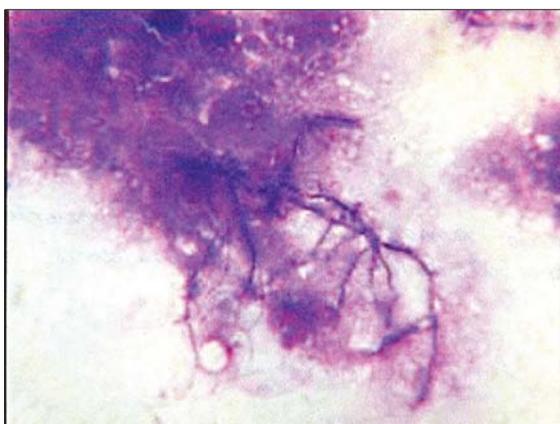


Figura 3 – Exame direto de exsudato obtido por drenagem de abscesso pulmonar. Coloração Giemsa 1000k.



Figura 4 – Aspectos macroscópicos do cultivo de *Nocardia brasiliense*

DISCUSSÃO

A nocardiose é infecção rara, localizada ou disseminada, de diagnóstico difícil, uma vez que não apresenta aspectos clínicos, laboratoriais ou radiográficos específicos¹⁶. Pode acometer indivíduos saudáveis, mas sua frequência é maior em portadores de deficiência de imunidade celular, como leucemia, AIDS, ou uso de terapia imunossupressora². O paciente descrito neste caso encontrava-se em uso de imunossupressor para tratamento de leucemia linfóide crônica, apresentando, desta forma, fatores predisponentes para desenvolvimento dessa patologia bacteriana.

As espécies mais frequentemente envolvidas em nocardiose são *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinia*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum* e *N. transvalensis*^{3, 12, 14} sendo *N. asteroides* considerada o principal agente com predileção pulmonar (70-90% dos casos)^{1, 5, 11, 13}. A espécie *N. brasiliensis* tem sido relacionada mais frequentemente a infecções cutâneas e subcutâneas localizadas, com formação de necrose e abscessos, podendo, no entanto, afetar o pulmão, onde produz lesões idênticas às causadas por *N. asteroides*¹¹, porém com menor número de casos relatados (5-14%)^{8, 13}. No presente caso, foi identificada *N. brasiliensis*, demonstrando, desta forma, a capacidade deste patógeno em promover infecção disseminada. Vários autores relacionam a alta taxa, de 26% a 63% de mortalidade da nocardiose, à capacidade de disseminação deste organismo e ao estabelecimento tardio do diagnóstico desta doença¹⁰.

Na nocardiose pulmonar, os achados radiográficos e tomográficos do tórax são variáveis, tais como, derrame pleural, múltiplos nódulos pulmonares e consolidações do espaço aéreo, com ou sem cavitações¹⁷. Despertou atenção neste caso, a presença de opacidade consolidativa, comprometendo o segmento lingular inferior, tendo base pleural e determinando espessamento do tecido intercostal adjacente. Outras opacidades semelhantes também foram vistas nos lobos superior, médio e inferior direitos. Derrame pleural e linfonodomegalias não foram observados. Devido à inespecificidade sob o ponto de vista de imagem, foi sugerida a realização de broncoscopia para melhor caracterização dos achados.

Para o diagnóstico definitivo de nocardiose, há necessidade de isolamento e identificação do organismo a partir de biópsia ou aspirado dos locais acometidos ou de secreção respiratória^{3, 12, 14}. Culturas de escarro são positivas em 90% dos pacientes, chegando a 100%, quando o lavado broncoalveolar é realizado⁶. Neste paciente, após os exames radiográficos, foi feita broncoscopia para coleta de lavado brônquico e realização de exames microbiológicos, os quais não se revelaram diagnósticos.

Geralmente, nesse tipo de nocardiose, a maior parte das amostras é obtida por meio de procedimentos invasivos, como biópsia transtorácica com agulha fina, naqueles pacientes que apresentam lesões pulmonares focais, ou biópsia pulmonar a céu aberto⁶. Para elucidação diagnóstica deste caso, foi realizada punção aspirativa percutânea do tórax, guiada por tomografia computadorizada, assim como drenagem dos nódulos de nádega e panturrilha, resultando material de aspecto fluido, purulento, inodoro.

Muitas vezes o diagnóstico é retardado pela dificuldade de cultivo da bactéria¹², bem como pelo fato de se utilizar, rotineiramente, nos exames microbiológicos, meios de cultivo seletivos que podem inibir o crescimento de *Nocardia* spp⁴, quando são pesquisados agentes específicos como, por exemplo, bacilo de Koch e *Legionella* spp. Ao exame direto, *Nocardia* spp caracteriza-se por ser um bacilo ramificado, Gram positivo e pela positividade à coloração de Ziehl-Neelsen (bacilo álcool-ácido resistente fracamente positivo). A característica álcool-ácido resistente do bacilo de Koch e o quadro clínico inespecífico podem levar a uma confusão diagnóstica, particularmente, nas regiões onde a tuberculose é uma doença prevalente¹⁵. Na cultura, o crescimento ocorre, geralmente, entre dois a cinco dias; entretanto, a incubação deve ser mantida por pelo menos três semanas para exclusão do diagnóstico¹.

A nocardiose em sua forma pulmonar pode estar sendo subdiagnosticada em vista da inespecificidade das manifestações clínico-radiológicas e da baixa suspeita clínica. Convém ressaltar que, neste paciente, a suspeita de *Nocardia* só foi levantada após o exame direto em coloração de Giemsa, dos exudatos obtidos por aspiração das lesões pulmonar e sub-

cutânea, uma vez que o paciente não vinha respondendo aos esquemas convencionais de antimicrobianos para o tratamento das pneumonias.

REFERÊNCIAS

1. Baldi, B. G.; Santana, A. N. C.; Takagaki, T. Y. Nocardiose pulmonar e cutânea em paciente usuário de corticosteróide. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32(6) 592-5, 2006.
2. Barata, C. H.; Oliveira, D. A. G.; Colombo, A.L.; Pereira, C. A. P. Abscesso cerebral por *Nocardia* sp. em paciente imunossuprimido. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33:609-12, 2000.
3. Corti, M. E.; Villafane-Fiotti, M. F. Nocardiosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*, 7(4):243-50, 2003.
4. Feigin, D. S. Nocardiosis of the lung: chest radiographic findings in 21 cases. *Radiology*, 159:9-14, 1986.
5. Gaude, G. S.; Hemashettar, B. M.; Bagga, A.S.; Chatterji, R. Clinical profile of pulmonary nocardiosis. *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences*, 41:153-157, 1999.
6. Gupta, K.; Mohan, A.; Sharma, S. K.; Guleria, R.; Bannerjee, U.; Pande, J. N. Pulmonary nocardiosis. *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences*, 38:197-200, 1996.
7. Hui, C. H.; Au, V.W.; Rowland, K.; Slavotinek, J. P.; Gordon, D. L. Pulmonary nocardiosis revisited: experience of 35 patients at diagnosis. *Respir Med*, 97(6):709-7, 2003.
8. Hwang, J. H.; Koh, W.; Suh, G. Y.; Chung, M. P.; Kim, H.; Kwon, O. J.; Lee, K. S.; Lee, N. Y.; Han, J. Pulmonary nocardiosis with multiple cavitory nodules in a HIV-Negative immunocompromised patient. *Internal Medicine*, 43(9) 852-854, 2004.
9. Koneman, W. E.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C. Diagnóstico Microbiológico. MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.
10. Matulionyte, R.; Rohner, P.; Uçkay, I.; Lew, D.; Garbino, J. Secular trends of *Nocardia* infection over 15 years in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Pathology*, 57:807-12, 2004.
11. Menéndez, R.; Cordero, P. J.; Santos, M.; Gobernado, M.; Marco, V. Pulmonary infection with *Nocardia* species: report of 10 cases and review. *European Respiratory Journal* 10:1542-6, 1997.
12. Narushima, M.; Suzuki, H.; Kasai, T.; Tsuzura, Y.; Tomita, S.; Endoh, S.; Yamada, M.; Ohtsuka, H. Case report: Pulmonary nocardiosis in a patient treated with corticosteroid therapy. *Respirology*, 7 (1):87-9, 2002.
13. Queipo-Zaragoza, J. A.; Broseta-Rico, E.; Alapont-Alacreu, J. M.; Santos-Durantez M.; Sánchez-Plumed, J.; Jimenez-Cruz, J. F. Nocardial infection in immunosuppressed kidney transplant recipients. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 38:168-173, 2004.
14. Saubolle, M. A.; Sussland, D. Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10) 4497-4501, 2003.
15. Silva, A. C. G.; Martins, E. M. L.; Marchiori, E. Nocardiose pulmonar em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida: relato de caso. *Radiologia Brasileira*, 35: (4) 235-238, 2002.
16. Uttamchandani, R. B.; Daikos, G. L.; Reyes, R. R et al. Nocardiosis in 30 patients with advanced human immunodeficiency virus infection: clinical features and outcome. *Clinical Infectious Disease*, 18:348-385, 1994.
17. Yoon, H. K.; Im, J.G. Ahn, J. M.; Han, M. C. Pulmonary nocardiosis: CT findings. *Journal of Computed Assisted Tomography*, 19:52-5, 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua Luis Petit, 298
CEP: 50070-230 Recife - PE

De 14 a 18 de
junho de 2009

36º Congresso
Brasileiro de
Análises Clínicas

9º Congresso
Brasileiro de
Citologia Clínica

Centro de Eventos
FIERGS

Porto Alegre - RS

www.cbac.org.br

PRÊMIO SBAC

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio SBAC é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio SBAC tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Análises Clínicas no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio SBAC, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio SBAC, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio SBAC é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio SBAC obrigatoriamente, deve ser apresentado na Sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio SBAC

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Alterações hematológicas e morfocitológicas em fluidos biológicos de trabalhadores do distrito industrial de Erechim, RS*

Hematologic and Morphocytologic alterations in biologic fluids of workers of the industrial district of Erechim, RS

Daniele Paula Simon¹, Lucila Ludmila Paula Gutierrez², Sandra Manoela Dias Macedo³ & Vanusa Manfredini³

RESUMO - Com o crescimento industrial crescem também as doenças ocupacionais causadas pelos efeitos nocivos das substâncias químicas utilizadas ou produzidas em processos industriais. Este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações hematológicas e morfocitológicas em amostras de fluidos biológicos de trabalhadores que se encontram sob estas condições. Para tanto, foram analisadas 23 amostras de sangue e líquido seminal de trabalhadores dos setores de solda, galvanoplastia, pintura e colagem de uma empresa do Distrito Industrial de Erechim (RS). O hemograma foi realizado através do contador eletrônico ABX MICROS 60; já as amostras de líquido seminal foram analisadas através de exames macroscópicos (como aparência e cor, volume, consistência e viscosidade e pH) e microscópicos (como contagem do número de espermatozoides, motilidade espermática e vitalidade). A faixa etária variou entre 18 e 45 anos, hemoglobina média de 15,78 g/dL, e hematócrito médio de 45%. A análise espermática também se manteve em níveis normais, sendo que somente uma das amostras apresentou quadro de azoospermia, o que, devido à idade e tempo de exposição, concluiu-se ser inerente a problemas na coleta, porém, para confirmar tal resultado, seria necessária uma nova amostragem. A monitorização biológica dos trabalhadores e do ambiente de trabalho, associada com o uso correto dos equipamentos de proteção individual, além da conscientização de empregados e empregadores é eficaz no que diz respeito à prevenção de possíveis intoxicações.

PALAVRAS-CHAVE - trabalhadores, hemograma, espermograma, substâncias químicas.

SUMMARY - The occupational diseases also grow with the industrial increase that are caused by harmful effects of chemical substances used or produced in industrial processes. The purpose of this work is to assess hematological and morphocytologic changes in biological fluid samples of workers that are found in these conditions. Because of this, 23 blood samples and seminal liquid of workers of welding, galvanizing, painting and pasting sectors at a company at the Industrial District of Erechim (RS) have been analyzed at URI School Laboratory – Erechim Campus. The hemogram was accomplished through the electronic counter ABX MICROS 60; although the seminal liquid samples were analyzed through macroscopic exams (as appearance and color, volume, consistency and viscosity and pH) and microscopic (as counting of spermatozoons number, spermatic motility and vitality). The age group has ranged from 18 to 45 years old. After these samples analysis, it was found out that there aren't contamination indications by occupational exposure, since the hemogram result has presented itself normal with average hemoglobin 15,78 g/dL, and average hematocrit of 45%. The spermatic analysis has also continued in normal levels where only one of the samples has presented an azoospermia feature and because of the age and time exposure, we have concluded it was due to a collecting problem, but to confirm such result it would be necessary a new sampling. The biological monitoring of workers and work environment associated with the correct use of individual protection equipments besides the employers and employes consciousness is effective concerning the prevention of possible intoxications.

KEYWORDS - workers, hemogram, spermiogram, chemical substances.

INTRODUÇÃO

A presença de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente de trabalho impõe que a exposição à qual os trabalhadores estão sujeitos seja avaliada de uma forma periódica, a fim de monitorar ou prevenir uma possível intoxicação (MILITÃO & RAFAELI¹).

Define-se a monitorização biológica, como "a medida e avaliação de agentes químicos ou seus produtos de bio-transformação em tecidos, secreções, excreções, ar exalado ou alguma combinação destes, para estimar a exposição ou risco à saúde quando comparado a uma referência apropriada" (BERLIN *et al.* apud CORDEIRO *et al.*²).

O principal objetivo da toxicologia ocupacional é a prevenção das alterações da saúde dos trabalhadores expostos a estas substâncias. Este objetivo não pode ser atingido, se

os níveis de exposição são mantidos em valores que possam constituir-se em risco inaceitável para a saúde ou a vida. Para assumir que um risco seja aceitável, deve-se identificá-lo e quantificá-lo. Para tanto, é necessário um conhecimento fundamental em toxicologia, que é da relação dose/efeito e/ou dose/resposta, isto é, com a prevalência de indivíduos que apresentam esse efeito determinado (GOYER³).

As alterações do estado de saúde (que podem conduzir a formas clinicamente detectáveis das doenças relacionadas com o ambiente de trabalho) reconhecem causas precisas na sua etiologia e, desta forma, podem ser prevenidas através de medidas preventivas que incluem a substituição da substância nociva responsável pelo efeito tóxico. Quando não é possível remover completamente a causa potencialmente responsável pela alteração do estado de

Recebido em 26/09/2007

Aprovado em 28/01/2009

*Laboratório Universitário de Análises Clínicas da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus Erechim, RS.

¹Farmacêutica-bioquímica.

²Docente do Centro Universitário IPA Metodista, Porto Alegre, RS.

³Docente do Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus Erechim, RS.

saúde, é necessário reduzir a exposição para tais substâncias, de modo a limitar a probabilidade de que esta exposição exerça um efeito nocivo sobre a saúde das pessoas expostas; e, ao mesmo tempo, controlar a exposição através da monitorização tanto do ambiente de trabalho quanto biologicamente (DELLA ROSA⁴).

A presença de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente de trabalho impõe que a exposição à qual os trabalhadores estão sujeitos seja avaliada sistematicamente. Programas de segurança e saúde no trabalho, bem como legislações específicas que visem à redução de exposições ocupacionais a agentes tóxicos têm importante função de garantir que o trabalhador tenha condições saudáveis e seguras de exercer sua profissão (MILITÃO e RAFAELI¹). Assim sendo, este trabalho tem como objetivo investigar possíveis alterações sanguíneas e citológicas no espermograma de trabalhadores ocupacionalmente expostos a substâncias químicas do Distrito Industrial de Erechim/RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram coletadas vinte e três amostras de sangue e líquido seminal de trabalhadores de uma Empresa do Distrito Industrial de Erechim e quinze amostras de indivíduos não expostos utilizados como grupo controle.

O trabalho desenvolvido caracteriza-se como uma pesquisa descritiva quanto aos seus objetivos. Em relação aos procedimentos técnicos, trata-se de uma pesquisa bibliográfica e experimental.

O presente trabalho seguiu as normas éticas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional Integrada, Campus de Erechim.

Os quatro setores avaliados foram: colagem, galvanoplastia, onde entram em contato com zinco, cobre, cromo, ácido sulfúrico e ácido crômico; o setor de solda, onde são utilizados: chumbo, estanho, cádmio e alumínio, e o setor de pintura (ÁVILA-CAMPOS¹⁸).

Procedimentos metodológicos

O hemograma foi realizado através do Contador Eletrônico ABX MICROS 60. O anticoagulante utilizado foi o EDTA. Para este trabalho os pacientes foram instruídos a respeito da importância da abstinência sexual de 2 a 5 dias e da higiene das mãos e do pênis no momento da coleta do sêmen. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS⁵), para os exames macroscópicos do líquido seminal são utilizados os seguintes procedimentos: a) aparência e cor: a amostra deve ser imediatamente analisada após liquefação, sendo que uma amostra normal tem uma aparência homogênea, aspecto gelatinoso e uma cor que pode variar de branco a cinza opalescente; b) volume: representa a somatória das secreções das glândulas anexas do trato genital masculino, como o líquido seminal vesicular, líquido prostático, das glândulas de Cowper, fluido epididimário, testicular e das ampolas. O valor normal para o volume espermático varia de 2 a 5 mL, com volume médio de 3,2 mL; c) viscosidade: para detectá-la foram utilizados métodos semiquantitativos. Com uma pipeta de 0,1 mL com 11 cm de coluna de líquido seminal, acionou-se o cronômetro e deixou-se pingar três gotas: (1) de 4,8 a 5,2 segundos: normal; (2) maior que 5,2 segundos: viscosidade elevada; (3) menor que 4,8 segundos: baixa viscosidade e d) pH: é determinado pelas secreções da próstata (ácida) e vesícula seminal (alcalina). Pode variar de 7,2 a 8, quando medido uma hora após a ejaculação. Já os exames microscópicos também padronizados pela

OMS⁵ são os mais importantes, porque complementam os achados macroscópicos. A análise microscópica inicial da amostra de sêmen consta do estudo da citologia, motilidade, morfologia e vitalidade.

O número de espermatozoides por mililitro varia entre 60 e 120 milhões. Números maiores (poliozoospermia) não são patogênicos. Números inferiores (oligozoospermia) são anormais. A contagem foi feita em Câmara de Neubauer e a diluição dependeu da concentração espermática.

A avaliação da motilidade foi realizada imediatamente após a liquefação. No espermograma avaliou-se a motilidade espermática através de técnica padronizada pela OMS, que classifica o movimento dos espermatozoides em 4 graus: grau A: motilidade rápida e progressiva linear (direcionais rápidos); grau B: motilidade lenta e/ou não linear (direcionais lentos); grau C: motilidade não progressiva (*in situ*) (erráticos) e grau D: imobilidade (imóveis). A amostra de sêmen foi considerada normal, se mais de 50% dos espermatozoides forem do tipo A e B, ou se pelo menos 25% dos espermatozoides encontrados forem grau A.

A morfologia foi determinada, sendo que os espermatozoides atípicos podem atingir até 30% dos espermatozoides analisados. Dentre os defeitos, devem ser analisadas as seguintes categorias: a) defeitos na cabeça: sem cabeça, dupla cabeça, cabeça gigante e cabeça de alfinete; b) defeitos na peça intermediária: peça intermediária com presença de restos citoplasmáticos ou mostrando uma angulação entre a cabeça e a cauda e c) defeitos na cauda ou flagelo: cauda dupla, espessa ou sem cauda.

Para a avaliação da vitalidade, esperou-se a liquefação total do sêmen, pois este é o ponto de equilíbrio ideal, no qual a concentração de substratos energéticos e o pH seminal favorecem a capacidade máxima de mobilização espermática. Para isso, foram usados os corantes eosina-nigrosina, onde foram contados 100 espermatozoides, e o resultado foi expresso em porcentagem.

RESULTADOS

Dos trabalhadores estudados, 48% encontravam-se no setor de solda, 22% no de galvanoplastia, 17% no de pintura, e os 13% restantes, no setor de colagem, como pode ser observado na Figura 1.

Quanto ao tempo de trabalho, no setor de solda os 11 funcionários encontram-se trabalhando nesta área, de 48 a 168 meses. Os cinco trabalhadores da galvanoplastia encontram-se ali de 1 a 120 meses. Já os quatro empregados do setor de pintura encontram-se neste setor de 2 a 120 meses. Por fim, no setor de colagem, os três funcionários estão trabalhando de 8 a 84 meses (Figura 2).

Os dados do hemograma não demonstraram nenhuma alteração quando comparados com os valores de referência (Tabela 1).

Quanto às características físico-químicas das amostras obtidas, pode-se observar que o volume e pH médio encontram-se em níveis normais, como mostra a Figura 3. De acordo com a OMS⁵, o volume, para ser considerado normal, precisa estar acima de 2 mL. E o pH médio, em amostras normais é de 7,2 a 8,0. Porém, como o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e a entrega do material na empresa foi superior a 60 minutos, fator que eleva o pH do líquido seminal, considera-se que este resultado está em níveis satisfatórios e dentro da normalidade.

Considerando ainda as características físico-químicas, o líquido seminal tem aspecto gelatinoso, cor branca opalescente. Porém, sua aparência pode ser menos opaca, se a

concentração de espermatozóides for muito baixa, ou de cor castanha, quando células vermelhas do sangue estiverem presentes. Todas as amostras apresentaram coloração normal e odor *sui generis*.

Das 23 amostras obtidas, 22 delas (96%) apresentavam a viscosidade em níveis normais; e apenas uma amostra (ou 4%) mostrou viscosidade elevada. Como se observa na Figura 4. Considerou-se com viscosidade elevada a amostra que demorou mais de 5,2 segundos para terminar de gotejar.

Quanto ao número de espermatozóides, 83% das amostras, ou seja, 19 trabalhadores, mostraram números iguais ou superiores a 20 milhões/mL. No entanto, 17%, ou 4 trabalhadores, apresentaram contagem espermática diminuída. Avaliando a vitalidade (Figura 5), 74% (17) das amostras apresentaram vitalidade acima de 70%. As amostras com vitalidade diminuída somam 9% (2), enquanto as que apresentaram necroespermia, ou seja, valores de espermatozóides mortos superiores aos normais, encontram-se em 17% (4).

Com relação a média percentual da motilidade, 65% das amostras apresentaram grau A, ou seja, motilidade rápida e progressiva linear (direcionais rápidos); 12% exibiram grau B, motilidade lenta e/ ou não linear (direcionais lentos); 6% apresentaram grau C, motilidade não progressiva (erráticos) e finalmente 17% apresentaram grau D ou imobilidade (Figura 6).

Com relação a média percentual das anomalias detectadas, observou-se que: 44% das amostras apresentaram espermatozóides de morfologia normal. Já 32% indicaram presença de anomalias de cabeça; as anomalias de segmento somam 10% enquanto 13% apresentam anomalias de cauda. Somente 1% apresentou gametas imaturos (Figura 7).

Pode-se constatar ainda, a presença de microrganismos patogênicos nas amostras de líquido seminal. *Trichomonas vaginalis* esteve presente em 60% das amostras analisadas, em 30% das amostras notou-se a presença de *Candida sp.* e em 10% foram observados Cocos intracelulares (Figura 8).

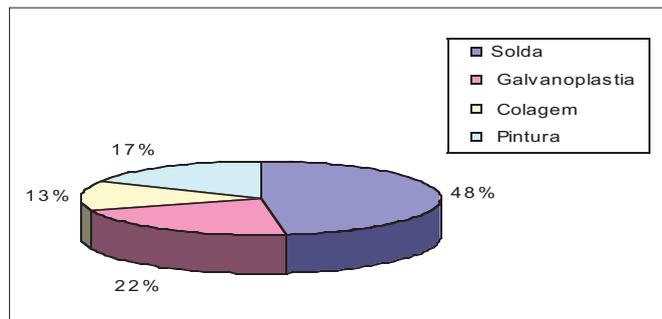


Figura 1: Percentual de trabalhadores distribuídos por setor

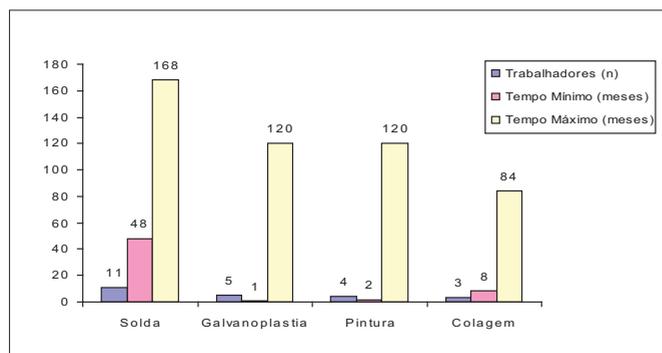


Figura 2: Tempo de serviço no setor (em meses)

TABELA I
Índices hematimétricos dos trabalhadores de uma empresa do Distrito Industrial de Erechim:

n	Caso 23	Controle 15	Valores de Referência*
Idade (anos)	30 ± 18,3	28 ± 17,3	-
Hemácias 10 ⁶ /mm ³	4,98 ± 1,17	4,90 ± 1,20	4,5 a 6,1
Leucócitos 10 ³ /mm ³	6,10 ± 4,80	5,90 ± 5,60	3,60 a 11,00
Hemoglobina (g/dL)	15,78 ± 2,05	14,5 ± 2,25	12,8 a 17,8
Hematócrito (%)	45 ± 4,94	43 ± 4,90	39 a 53
Plaquetas 10 ³ /mm ³	188 ± 82,73	202 ± 84	120 a 400
VCM (fm ³)	90 ± 9,89	87 ± 10	80 a 98
CHCM (g/dL)	35 ± 2,74	34 ± 2,88	31 a 36
RDW (%)	11,60 ± 1,13	11,60 ± 1,13	12 a 15

Valores expressos em média ± DP; *FAILACE[®].

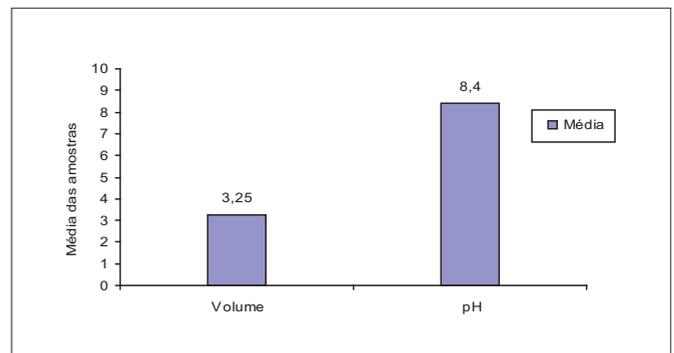


Figura 3: Médias do volume e pH das amostras obtidas

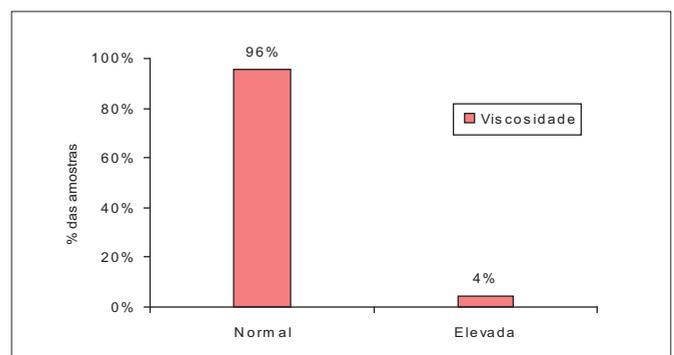


Figura 4: Percentual de viscosidade das amostras

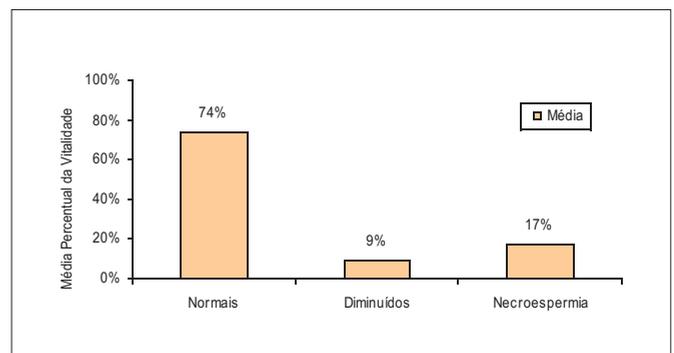


Figura 5: Médias percentuais da vitalidade em 1 hora

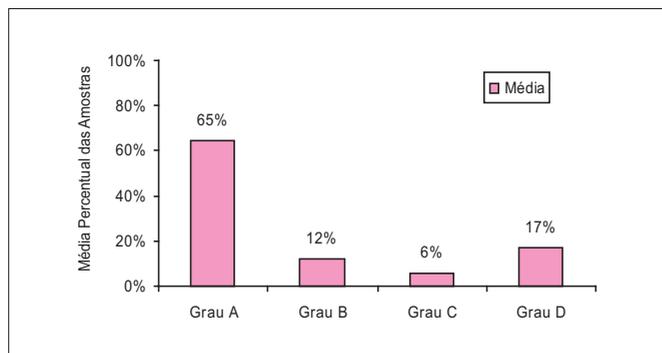


Figura 6: Médias percentuais da motilidade espermática

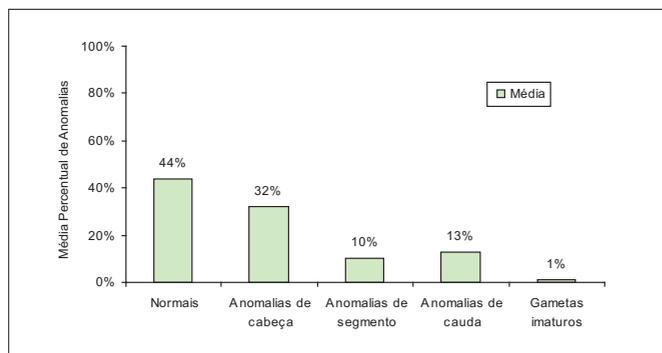


Figura 7: Médias percentuais das anomalias encontradas nas amostras

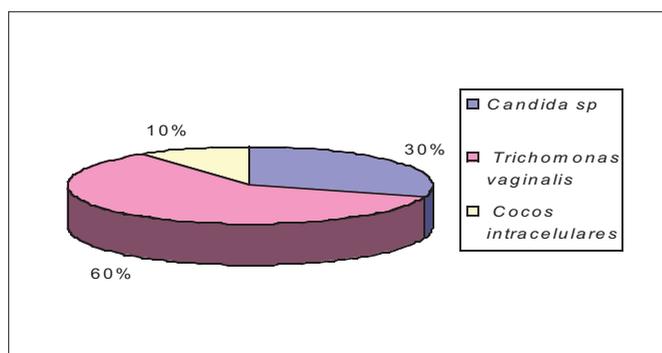


Figura 8: Percentual de microorganismos encontrados em amostras de líquido seminal

DISCUSSÃO

Um dos pontos a se destacar nos resultados dos espermogramas é o de um jovem de 23 anos, que apresentou quadro de azoospermia. Porém, o rapaz relatou em questionário não ter problemas de ordem sexual, histórico de doença, uso de medicamento, relatou também não ter feito vasectomia, ingerir bebidas alcoólicas e não ser tabagista. Mencionou também fazer uso de todos os equipamentos de proteção individual (EPIs).

A azoospermia é a ausência de espermatozoides no líquido seminal, o que pode ocorrer por falta total de espermatogênese ou pela presença de obstáculo em ambas as vias espermáticas. Pode ainda ocorrer devido ao uso de medicamentos, drogas, álcool, e em alguns casos de intoxicação por metais (PIVA¹⁷).

Como o rapaz faz uso dos equipamentos de proteção individual, não bebe, não fuma, não utiliza medicamentos e o hemograma apresentou normalidade, o ideal seria realizar uma nova coleta, porém, como foi anteriormente citado, há

uma relutância dos trabalhadores em fazê-la. Para descartarmos a hipótese de problema genético, o que poderia ser confirmado através de novas amostras, o mais provável é que se trate de um erro de coleta.

A maior parte da população deste estudo não mostrou alteração nos parâmetros avaliados, mas um significativo aumento da incidência de infertilidade masculina tem sido descrito na literatura mundial, o que gera questionamentos sobre suas causas. Parte deste efeito pode dever-se a ação de substâncias químicas tóxicas sobre o sistema endócrino, sendo muitas delas utilizadas em processos laborais. Dentre os principais interferentes endócrinos que podem causar infertilidade masculina destacam-se agrotóxicos, metais pesados, resíduos de processos industriais (dioxinas, bifenilas policloradas, dibromoetileno, ftalatos, PVC e etanol) (QUEIROZ & WAISSMANN⁷).

Os principais agrotóxicos com efeitos descritos no sistema reprodutivo são beta-HCH (hexaclorohexano), carbaril, clordano, dicofol, dieldrin, DDT (diclorodifeniltricloroetano) e seus metabólitos, endosulfan, heptacloro e Hepoxido, lindano (gama-HCH), malation, metomil, metoxicloro, mirex, oxiclordano, paration, piretróides sintéticos, toxafeno e trans-nonacloro (QUEIROZ & WAISSMANN⁷; ALVES *et al.*⁸).

Acredita-se que os metais talvez sejam os agentes tóxicos mais conhecidos pelo homem. Há aproximadamente 2000 anos a.C., grandes quantidades de chumbo eram obtidas de minérios, como subproduto da fusão da prata e isso provavelmente tenha sido o início da utilização deste metal pelo homem (ÁVILA-CAMPOS⁹).

De acordo com o estudo realizado por NOVELLI e cols¹⁰, as células espermáticas de *Paracentrotus lividus* (um equinodermo) apresentaram alterações na presença dos metais: prata, cobre, zinco, arsênio, cromo, cádmio chumbo e níquel, sendo que o nível de toxicidade encontrado nas células seguiu esta mesma ordem (prata>cobre>zinco...).

O chumbo inorgânico tem sido considerado um agente tóxico às células reprodutivas humanas desde a antiguidade. Estudo em animais e humanos observou efeitos deletérios na função reprodutiva humana (BONDE & KOLSTAD¹¹). Diversos estudos relataram redução na qualidade e quantidade de esperma em trabalhadores ocupacionalmente expostos a chumbo (ASSENATO, CULLEN apud BONDE & KOLSTAD¹¹; QUEIROZ & WAISSMANN⁷). TELISMAN e cols¹⁰ observaram aumento da concentração de células imaturas no esperma relacionadas ao chumbo em homens expostos mesmo a baixas concentrações do metal (49µg Pb/L sangue), além de alterações hormonais. Efeito sinérgico é observado entre chumbo e cádmio em humanos e efeito aditivo com decréscimo de selênio no soro, ambos os efeitos levam a aumento sérico de testosterona. Estes achados podem estar envolvidos na iniciação e desenvolvimento de câncer de próstata, pois o aumento de testosterona no progresso do câncer de próstata acontece no estágio inicial (TELISMAN *et al.*^{12,13}).

A galvanoplastia (processo eletrolítico que consiste em recobrir um metal com outro) é um dos processos industriais que mais utiliza o cádmio (entre 45 a 60% da quantidade produzida por ano). O homem expõe-se ocupacionalmente na fabricação de ligas, varetas para soldagem, baterias de níquel-cádmio, varetas de reatores, fabricação de tubos para TV, pigmentos, esmaltes e tinturas têxteis, fotografia, litografia e pirotecnia, estabilizador plástico, fabricação de semicondutores, células solares, retificadores e lasers (KLAASSEN¹⁴; ÁVILA-CAMPOS⁹). Cádmio produz lesão testicular por dano vascular e a extensão da lesão

determina comprometimento das células germinativas e de Leydig. Esta lesão pode determinar tumores de células de Leydig, degeneração tubular (em exposições a altas doses), atrofia, ainda indução de necrose tecidual e deficiente produção de androgênio (WAALKES *et al.*¹⁵; WAISSMANN¹⁶). Em adição ao sistema reprodutivo, os interferentes endócrinos podem interferir em outros sistemas como o imunológico e o metabólico-endócrino. Estes efeitos são decorrentes de exposições crônicas que exigem monitorização, mas requerem tempo para as manifestações ocorrerem. A identificação e avaliação do efeito dessas substâncias requerem esforço conjunto de pesquisadores, industriais, legisladores e governo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos voluntários do estudo e ao Farmacêutico Daniel Schwarzbach pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

- MILITÃO, A. G.; & RAFAELI, E. Neuropatias por Intoxicação Ocupacional. Disponível em: <<http://www.eps.ufsc.br/ergon/revista/artigos/angeliete.pdf>> . Acesso em: 14 fev. 2005.
- CORDEIRO, R.; LIMA FILHO, E. C.; SALGADO, P. E. T. Reajustando o Limite de Tolerância Biológica Aplicado à Plumbemia no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 12(4): 455-463, 1996.
- GOYER, R. A. Toxic Effects of Metals. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. Toxicology. The Basic Science of Poisons. 5. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996.
- DELLA ROSA, H. V. Toxicon Assessoria Toxicológica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.grupo-ramazzini.med.br/textosdownload/ResumoToxicologia.doc>>. Acesso em: 15 fev. 2005.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). Manual de Laboratório para o Exame do Sêmen Humano e Interações Esperma – Muco Cervical. 3. ed. São Paulo: Santos, 1994.
- FAILACE, R. Hemograma: manual e interpretação. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- QUEIROZ, E. K. R.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(3): 485-493, 2006.
- ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23(5): 1005-1014, 2007.
- ÁVILA-CAMPOS, M. J. Metais Pesados e seus Efeitos. Disponível em: <<http://www.mundoquimico.hpg.ig.com.br>> . Acesso em: 23 set. 2005.
- NOVELLI, A. A.; LOSSO, C.; GHETTI, P. F.; GHIRARDINI, A. V. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. Environ. Toxicol. Chem., 22(6): 1295-1301, 2003.
- BONDE, J. P.; KOLSTAD, H. Fertility of Danish battery workers exposed to lead. Int. J. Epidemiol., 26(6): 1281-1288, 1997.
- TELISMAN, S.; COLAK, B.; PIZENT, A.; JURASOVIC, J.; CVITKOVIC, P. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. Environ. Res., 105(2): 256-266, 2007.
- TELISMAN, S.; CVITKOVIC, P.; JURASOVIC, J.; PIZENT, A.; GAVELLA, M. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. Environ. Health Perspect., 108(1): 45-53, 2000.
- KLAASSEN, C. D. Metais Pesados e Antagonistas de Metais Pesados. In: GOODMAN; GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana, 2003.
- WAALKES, M.P.; ANVER, M.; DIWAN, B. A. Carcinogenic effects of cadmium in the noble (NBL/Cr) rat: induction of pituitary, testicular, and injection site tumors and intraepithelial proliferative lesion of the dorsolateral prostate. Toxicol. Sci., 52: 154-161, 1999.
- WAISSMANN, W. Endocrinologia associada ao trabalho. In: MENDES, R. Org. Patologia do Trabalho. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- PIVA, S. Espermograma: Análises e Técnicas. 7. ed. São Paulo: Santos, 1998.
- ÁVILA-CAMPOS, M. J. Metais Pesados e seus Efeitos. Disponível em: <<http://www.mundoquimico.hpg.ig.com.br>> . Acesso em: 14 set 2007.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. MsC. Vanusa Mnafredini
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621. Bairro: Fátima CEP: 997000-000 Erechim RS.
Fone 55 54 3520 9000 ramal 9073
vanusa@uri.com.br



Educação continuada à distância

www.sbac.org.br/ead

PNCQ E-Learning:
Controle de qualidade e Sistemas da Qualidade em Análises Clínicas

SBAC Empresas e Negócios :
Transformando pessoas, transformando negócios.

SBAC Sênior:
Renovação e aprofundamento em Análises Clínicas

SBAC Júnior:
Seus primeiros passos no mundo das Análises Clínicas

PRÊMIO NEWPROV

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio NEWPROV é promovido pela **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC**, com o patrocínio da NEWPROV PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 2.000,00 dois mil reais, na data da outorga, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio NEWPROV tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Microbiologia no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho sobre Microbiologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio NEWPROV poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio NEWPROV, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio NEWPROV é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio NEWPROV obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio NEWPROV

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Importância do controle de qualidade para a redução das amostras insatisfatórias cérvico-vaginais

The importance of quality control to reduce unsatisfactory cervical smears

Etlinger DLR¹, Ducatti C², Gomes LP², Pereira SMM¹, Teixeira MS³, Silva VL³, Yamamoto LSU².

RESUMO - O objetivo deste estudo foi analisar as não-conformidades analíticas dos exames citopatológicos realizados no Setor de Citologia Oncótica, da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (SCO-IAL), e discutir ações corretivas para minimizar essas ocorrências. O SCO-IAL recebeu 44.197 amostras citopatológicas cérvico-vaginais enviadas pelas Unidades de Saúde (US), de setembro de 2005 a fevereiro de 2007, que foram coradas pelo método de Papanicolaou e classificadas segundo a Nomenclatura Brasileira recomendada pelo Ministério da Saúde. Do total, 1.155 (2,61%) foram classificadas como insatisfatórias, sendo: 351 por artefatos de dessecação; 198 pela presença de piócitos; 98 por material insuficiente; 47 pela presença de sangue e 12 por superposição celular. Em 449 casos, houve associação de duas ou mais causas; sendo o dessecação presente em 351 casos. Das 198 amostras insatisfatórias pela presença de piócitos, 37 apresentaram agentes infecciosos. Observou-se também nesse mesmo período que dos 1.558 (3,52%) casos de atipias de significado indeterminado, 371 foram limitados em seu diagnóstico. Os resultados obtidos demonstram que programas de treinamento nas US são a melhor estratégia para melhoria na qualidade das amostras. O controle de qualidade interno e externo, desde a colheita até a emissão dos laudos, é fundamental para o sucesso dos programas de rastreamento citológico.

PALAVRAS-CHAVE - Amostras insatisfatórias, Papanicolaou, Controle de qualidade, Avaliação analítica.

SUMMARY - The purpose of this study was to analyze the analytic non-conformity of cytopathologic exams realized in Cytology Section of the Division of Pathology of Instituto Adolfo Lutz (SCO-IAL), and to discuss corrective actions to reduce these occurrences. The SCO-IAL received 44,197 cervical smears from Unidades de Saúde (US), from September 2005 to February 2007, stained by the Pap method and classified by the Brazilian Nomenclature recommended by the Health Ministry. Of the total, 1,155 (2.61%) were classified as unsatisfactory being: 351 by air-drying artifacts; 198 by purulent smears; 98 insufficient cells; 47 for obscuring blood and 12 for thick areas. In 449 cases, there was an affiliation of two or more causes, being the air-drying artifacts present in 351 of them. Of the 198 unsatisfactory samples for purulent presence, 37 presented infectious agents. It was also observed in that same period that of 1,558 (3.52%) of atypical squamous cells, 371 were limited in their diagnoses. The results demonstrated that program of training on the Unidades de Saúde are the best strategy for improvement on quality from the samples. The internal and external quality control, since the smear preparation to emission of report, is fundamental for the success of programs of cytological screening.

KEYWORDS - unsatisfactory samples, Pap test, quality control, post-analytical available.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero é uma doença com alta prevalência e incidência e, dentre todos os tipos de câncer, é o que apresenta um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, chegando perto de 100% quando detectado precocemente¹.

A estimativa do INCA para o ano de 2006 foi de 19.260 novos casos de câncer cervical no Brasil, sendo que, para o Estado de São Paulo a taxa estimada é de 18,67 novos casos para 100.000 mulheres². Esta neoplasia é um importante problema de Saúde Pública, pois sua incidência pode ser reduzida através de programas de rastreamento eficientes^{3,4,5}.

O escrutínio em grandes populações pelo método de Papanicolaou é considerado um método efetivo para detectar lesões precursoras e diminuir a incidência de lesões invasoras e mortalidade⁶. Ainda que seja um exame rápido, de baixo custo e efetivo para detecção precoce, sua técnica de realização é vulnerável⁷.

Um dos maiores problemas que os laboratórios de citopatologia enfrentam em sua rotina são as altas taxas de resultados falso-negativos. Diversos estudos têm demonstrado que resultados falso-negativos variam de 6% a 56% e as principais causas de erros estão relacionadas à coleta, erros de escrutínio e de interpretação dos diagnósticos, outros

relatam que 2/3 dos resultados falso-negativos são causados por erros de amostragem e o restante é causado por erros de detecção^{1,8}.

Equipes da Secretaria de Estado da Saúde na Rede Pública observaram que um dos pontos críticos nos exames preventivos e detecção precoce de neoplasias de colo uterino e de mama têm sido a falta de profissionais treinados para a colheita do material, bem como a falta de padronização nos procedimentos de rotina, colheita e orientação aos profissionais envolvidos⁹.

Outro fator importante para a garantia do exame citopatológico é a qualidade de fixação das amostras, que representa um dos grandes problemas para o diagnóstico laboratorial.

Segundo a Nomenclatura Brasileira adotada pelo Sistema de Informação do Controle de Câncer de Colo Uterino – SISCOLO, a amostra pode ser considerada insatisfatória na fase pré-analítica por: ausência de identificação da paciente na amostra e/ou forma de requisição; lâmina quebrada e que não pode ser reparada ou outras causas alheias ao laboratório. Já na fase analítica, as causas podem ser: componente epitelial escamoso insuficiente (menos de 10% da lâmina); presença de sangue, piócitos, superposição celular, fixação deficiente ou artefatos de dessecação, contaminação ou qualquer outro motivo que prejudique a interpretação em aproximadamente 75% da lâmina.

A designação "insatisfatória" indica que a amostra não é

Recebido em 26/12/2007

Aprovado em 29/01/2009

* Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

¹ Pesquisador Científico do Setor de Citologia Oncótica.

² Aprimorandas do Setor de Citologia Oncótica.

³ Funcionárias do Setor de Citologia Oncótica.

confiável na detecção de anormalidades epiteliais cervicais, no entanto, qualquer anormalidade epitelial é importante e deve ser relatada, indiferentemente da abrangência da amostra adequada. Na presença de células anormais, a amostra nunca deverá ser classificada como "insatisfatória"¹⁰. Por recomendação do Ministério da Saúde a avaliação insatisfatória é realizada por mais de um observador nas amostras que apresentam limitações pela presença de sangue. Dados do Monitoramento Externo da Qualidade realizado nos últimos 5 anos, pelo Instituto Adolfo Lutz, mostraram a ocorrência de 1,5% de alterações epiteliais atípicas nos casos inicialmente classificados pelos laboratórios de origem como insatisfatórios, sendo 0,13% re-classificados como HSIL ou lesões invasivas¹¹.

OBJETIVO

O presente estudo propõe analisar as principais causas de resultados insatisfatórios na fase analítica dos exames citopatológicos e discutir as ações corretivas que podem ser implantadas para minimizar estas ocorrências.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 44.197 amostras citopatológicas cérvico-vaginais enviadas ao Setor de Citologia Oncótica, da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, por quatro Unidades de Saúde da Capital e 15 Unidades de Saúde do Interior de São Paulo, no período de setembro de 2005 a fevereiro de 2007. As amostras foram fixadas em polietilenoglicol e/ou propilglicol e coradas pelo método de Papanicolaou. As amostras foram classificadas segundo a Nomenclatura Brasileira recomendada pelo Ministério da Saúde, e a avaliação dos insatisfatórios está dividida em 6 grupos: artefatos de dessecamento, intensa quantidade de piócitos, material escasso, intensa superposição celular, sangue e associação de duas ou mais causas. Segundo os critérios de controle de qualidade interno, as amostras consideradas insatisfórias foram revisadas por mais dois observadores.

RESULTADOS

Das 44.197 amostras, 1.152 (2,60%) foram rejeitadas para análise na fase pré-analítica e 1.155 (2,61%) foram classificadas como insatisfórias na fase analítica.

Dentre as amostras insatisfórias, 351 (30,39%) foram por artefatos de dessecamento, 198 (17,14%) por presença de piócitos, 98 (8,48%) apresentaram material escasso, 47 (4,07%) pela presença de sangue e 12 (1,04%) por superposição celular (Gráfico 1).

Em 449 (38,88%) casos houve associação de mais de uma causa, sendo que 351 (78,17%) apresentaram o dessecamento como uma de suas causas. Das 198 amostras insatisfórias pelo obscurecimento por piócitos, 37 (18,68%) apresentaram agentes infecciosos, sendo 22 (11,11%) *Candida sp*, 12 (6,06%) *Trichomonas vaginalis* e 3 (1,51%) bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*).

Nos 14 (1,2%) casos inicialmente diagnosticados como alterações epiteliais atípicas e com diagnóstico final de insatisfório, 12 foram células escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas (ASC-US), 1 células atípicas de significado indeterminado não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H) e 1 lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL); por outro lado, 23 casos inicialmente classificados como insatisfórios pelo primeiro observador, receberam diagnóstico final de alte-

rações epiteliais atípicas, sendo 18 ASC-US, 3 ASC-H, 1 células glandulares atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas (AGC) e 1 lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL).

A distribuição dos ASC-US e ASC-H nas 44.197 amostras foi de 3,52% (1.558); destes, 371 foram limitados por alguma causa, sendo 171 (46,10%) por artefatos de dessecamento, 90 (24,26%) por presença de piócitos, 37 (9,97%) pela presença de sangue e 11 (2,96%) por superposição celular. Em 62 (16,71%) observou-se mais de uma causa como responsável pela limitação do diagnóstico das amostras. Destas, 54 (87,09%) apresentaram artefatos de dessecamento como uma das causas de limitação.

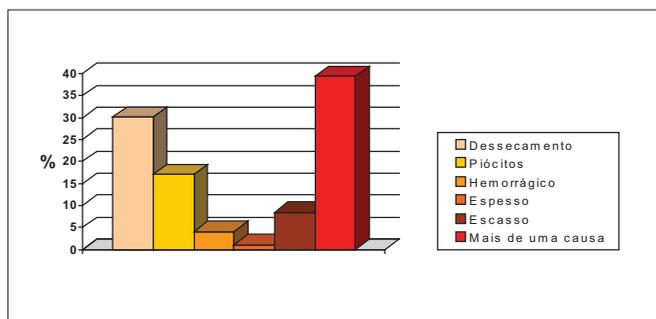


Gráfico 1. Representação da distribuição das 1.155 amostras insatisfórias em 2006

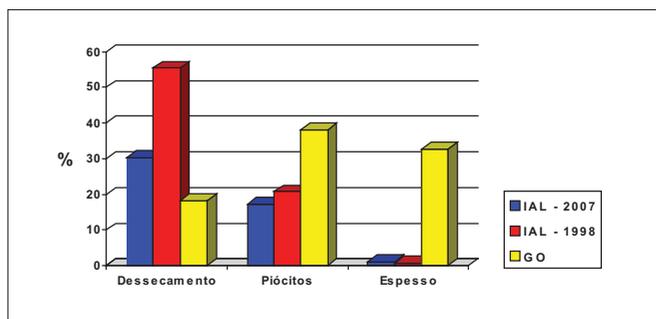


Gráfico 2. Comparação das porcentagens de casos insatisfórios entre o Instituto Adolfo Lutz e Goiânia

DISCUSSÃO

A implementação de procedimentos de controle de qualidade interno e externo nos laboratórios melhora o desempenho dos profissionais e a qualidade diagnóstica são passos fundamentais para o sucesso de programas de rastreamento citológico.

O aprimoramento e a garantia da qualidade abrangem todas as etapas do processo, desde a colheita dos espécimes (fase pré-analítica) até a emissão dos laudos (fase pós-analítica) incluindo todos os diagnósticos negativos, pré-neoplásicos e neoplásicos e casos insatisfórios (fase analítica).

Para a implantação do sistema de controle de qualidade, o Setor de Citologia Oncótica realiza relatórios mensais onde é possível analisar o desempenho de cada US. Quando detectado mais de 2% de amostras insatisfórias por 3 meses consecutivos, ou mais de 4% em 1 mês, é feito contato com o responsável pela colheita do material citopatológico para relatar as não-conformidades e sugerir possíveis melhorias para a qualidade da amostra enviada.

Sum e colaboradores relataram que houve redução de 5% para 0,3% nas taxas de resultados insatisfórios após treinamento adequado aos profissionais que realizam a

colheita do exame de Papanicolaou¹², demonstrando que os programas de treinamento nas Unidades de Saúde são a melhor estratégia para atingir este objetivo.

Observamos nesta análise que aproximadamente 30,13% dos resultados insatisfatórios têm como causa artefatos de dessecação, estando presente também em 46,1% das amostras que receberam diagnóstico de atipias de significado indeterminado. Foi possível analisar a alta frequência de associação entre duas ou mais causas de insatisfatório, sendo os artefatos de dessecação a causa mais frequente. A fixação imprópria causada pela ação do polietilenoglicol e/ou propinilglicol, devido a equívocos de preparo ou quantidade insuficiente/excesso de material são as maiores causas de dessecação de material. No estudo anterior realizado neste laboratório, com casuística de 66.212 casos de esfregaços cérvico-vaginais, 4,39% foram considerados insatisfatórios. Utilizou-se para comparação nesta análise, as amostras insatisfatórias por: artefato de dessecação (55,43%), material purulento (20,72%) e material espesso (0,76%)¹³.

Estudo realizado por Amaral e colaboradores na região de Goiânia mostrou índices de insatisfatório de 38,19% por material purulento, 32,73% por material espesso e 18,18% por dessecação (Gráfico 2). Observaram ainda que, 30% dos esfregaços apresentavam-se dessecados (mal fixados) limitando a análise. Os fatores obscurecedores que tornaram as amostras insatisfatórias foram purulento e áreas espessas, erros ocorridos na coleta que poderiam ser evitados com uma limpeza adequada do colo e distribuição adequada do material na lâmina⁸.

Os treinamentos realizados pela Fundação Oncocentro de São Paulo, nas Unidades de Saúde, no período de novembro de 2001 à março de 2003¹⁴, refletiram na redução significativa de resultados insatisfatórios de 5% em 2001, para 2,6% em 2006, sendo que em 2005, os índices de insatisfatório decaíram a 0,59%. Pudemos perceber que em 2006 houve um aumento da porcentagem de amostras insatisfatórias que haviam chegado a valores ideais no ano anterior. Acreditamos que por causa da rotatividade de profissionais as taxas aumentaram de um ano para o outro, o que nos leva a concluir que os treinamentos devem ser contínuos e, pelo que observamos nos nossos resultados, devem ser realizados a cada dois anos.

REFERÊNCIAS

1. CORTE, L.M.D., GONSALVES, J.C., SILVA, C.S., DUTRA, M.F., ROCHA, D.B., UTIZG, C.B., VALCHER, R.A., LUCAS, C.A.P., DALLA CORTE, E.A., VARGAS, V.R.A. Análise da concordância interobservadores em exames de Papanicolaou. News Lab, 80: 98-106, 2007.
2. Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA).

<http://www.inca.gov.br> Acesso em 25/05/2007.

3. BALLEGOOIJEN M, MARLE EA, PATNICK J, LYNGE E, ARBYN M, ANTTILA A, RONCO G, DIK J, HABBEMA F. Overview of important cervical cancer screening process values in European Union (EU) countries, and tentative predictions of the corresponding effectiveness and cost-effectiveness. Eur J Cancer. 36: 2177-2188, 2000.
4. FERLAY J, BRAY F, PISANI P, PARKIN DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5, IARC Press, Lyon (2001).
5. PARKIN DM, BRAY FI, DEVESA SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer 37. Suppl. 8, pp. S4-S66, 2001.
6. KOTASKA A.J. & MATISIC J.P. Cervical cleaning improves Pap smear quality. CMAJ 169(7): 666-9, 2003.
7. CAETANO, R., VIANNA, C.M.M., THULER, L.C.S., GIRIANELLI, V.R. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, 16(1): 99-118, 2006.
8. AMARAL, R.G., RIBEIRO, A.A., MIRANDA, F.A., TAVARES, S.B.N., SOUZA, N.L., MANRIQUE, E.J.C., ALBUQUERQUE, Z.B.P., FONSECHI-CARVASAN, G. Fatores que podem comprometer a qualidade dos exames citopatológicos no rastreamento do câncer do colo do útero. RBAC, vol. 38(1): 3-6, 2006.
9. Fundação Oncocentro de São Paulo, FOSP. <http://www.fosp.saude.sp.gov.br> Acesso em 10/05/2007.
10. Sociedade Brasileira de Citologia Clínica (SBCC) e Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Lista de verificação para acreditação de laboratórios de análises clínicas e citologia clínica. Item 2.2.2 - Colheita e cadastro das amostras, 2001.
11. PEREIRA, S.M.M.; RAMOS D.E.L.; YAMAMOTO L.S.U.; SHIRATA N.K.; DI LORETO C.; FERRAZ M.G.M.C.; LONGATTO-FILHO A.; Monitoramento externo da qualidade em citopatologia cervical e o reflexo na rotina dos laboratórios da rede pública. DST J. bras. Doenças Sex Transm. 18 (3): 172-177, 2006.
12. SUM, M.Y., LAI, A., LEUNG, S.L. Performance of nurses in the Department of Health as service providers for a cervical screening programme. Hong Kong Med. J., 11 (3), 2005.
13. FAGUNDES, M.C.S.; HARDT, L.L.; SAITO, S.; YAMAMOTO, L.S.U.; LONGATTO-FILHO, A.; UTAGAWA, M.L. Amostra inadequada em screening de esfregaços cérvico-vaginais: as principais causas. Laes & Haes. 22 (128): 94-100, 2001.
14. Fundação Oncocentro de São Paulo, FOSP. http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/serv_prog.html Acesso em 29/06/2007.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Av. Dr. Arnaldo, 355 - 7º andar - Setor de Citologia Oncótica - Divisão de Patologia, CEP: 01246-000.

danielaeltinger@terra.com.br



*Faça como os melhores:
Acredite o seu laboratório.*

Saiba mais. Acesse: www.dicq.org.br

PRÊMIO CFF

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, com o patrocínio do Conselho Federal de Farmácia;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas de Farmacêuticos-bioquímicos na área de Citologia no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho de Farmacêutico-bioquímico sobre Citologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores Farmacêuticos-bioquímicos deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio CFF, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio CFF, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio do CFF é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio CFF, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio CFF

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Possíveis discrepâncias dos achados colposcópicos, citológicos, histológicos e moleculares — relato de um caso de pequena lesão cervical

Possible discrepancies of findings colposcopic, cytology, histology and molecular - story of a case of small cervical injury

FILIPPIN, Carla¹; HAMADA, Fábio Massayuki²; CHISTOFOLETTI, Larissa Duarte³; VIEIRA, Daniella Serafin Couto⁴; VITURI, Cidônia de Lourdes⁵

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar as discrepâncias observadas nos exames colposcópicos, citológicos e histológicos em um caso de micro-lesão cervical. Este é um estudo de acompanhamento de uma paciente com lesão cervical uterina. Os autores revisaram o prontuário médico da paciente quanto aos dados clínicos e exames colposcópicos de colo uterino, exame citológico de raspado cervical uterino, exame histológico cervical uterino e biologia molecular para HPV de raspado cervical. Durante o acompanhamento da paciente estudo encontramos discrepâncias na tríade colposcopia-citologia-histologia em várias etapas da evolução do quadro. O diagnóstico final da paciente depois de oito avaliações durante 1 ano e meio foi de Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau e neoplasia intra-epitelial cervical, nos exames citológicos e histológicos respectivamente, e foi encaminhada para conização. É um caso de micro-lesão cervical, onde a coleta mesmo orientada pela colposcopia, não foi satisfatória em algumas etapas do diagnóstico, dificultando o exame histológico. A utilização da tríplex diagnóstica colposcopia-citologia-histologia bem como teste de biologia molecular durante todo acompanhamento da paciente forneceu abordagem segura aos procedimentos terapêuticos, evitando desta forma a progressão para o câncer cervical uterino invasivo.

PALAVRAS-CHAVE - Citologia, Colposcopia, Histologia, HPV.

SUMMARY - The objective of this work was to evaluate the discrepancy observed in the colposcopic, cytology and histology examinations in a case of cervical micron-injury. This is a study of accompaniment of a patient with uterine cervical injury. The authors had revised the medical handbook of the patient how much to the clinical data and uterine examinations colposcopic, cervical scraped cytological examination of uterine, uterine cervical histology examination and molecular biology for scraped HPV of cervical. During the accompaniment of the patient study we find discrepancies in the triad colposco-cytology-histology in some stages of the evolution of the picture. The final diagnosis of the patient after eight evaluations during 1,5 years it was of HSIL degree and cervical intra-epithelial neoplastic, in the cytology and histology examinations respectively, and was directed for conization. It is a case of cervical micron-injury, where the collection exactly guided by the colposcopia, became imperfection making it difficult the histology examination. The use of the diagnostic triad colposcopic-cytology-histology as well as test of molecular biology during all accompaniment of the patient supplied safe boarding the therapeutically procedures, preventing of this form the progression for the invasive uterine cervical cancer.

KEYWORDS - Cytology, Colposcopic, Histology, HPV.

INTRODUÇÃO

A identificação das lesões precursoras do carcinoma cervical invasivo é de grande importância no prognóstico e terapêutica das pacientes. Vários exames são utilizados na avaliação destas lesões. Dentre eles destaca-se a utilização do exame citológico acompanhado de colposcopia. Dependendo do grau da lesão se faz necessário o exame histológico¹.

Dentre as patologias do colo do útero 90% estão associadas ao HPV. No Brasil, dentre os tumores que acometem as mulheres, a mortalidade por câncer do colo de útero ocupa a quarta posição, em 2005, com 7,01% dos óbitos. O HPV está presente em 99% dos casos do câncer do colo de útero².

A infecção da mucosa genital pelo vírus se localiza normalmente na transição escamo colunar do epitélio ou zona de transformação, onde as células proliferativas estão mais

expostas e leva freqüentemente ao aparecimento de uma alteração morfológica conhecida como colicitótica, caracterizada pelo amplo halo perinuclear, com as bordas delimitadas e normalmente binucleação, com núcleos hiper-cromáticos e com contornos irregulares¹.

Os HPVs são classificados como de baixo, médio e alto risco. Os de alto risco expressam proteínas com potencial oncogênico E6 e E7, capazes de imortalizar e eventualmente transformar células em cultura. Estas proteínas interagem especificamente com proteínas celulares envolvidas no controle da proliferação celular, proteína supressora de tumor como pRB e p53. A ligação da proteína E6 dos HPVs de alto risco à p53 causa a rápida degradação da última, levando a perturbação do controle de crescimento celular, assim acredita-se que o potencial oncogênico destes vírus seja parte devida dessas interações³.

A microscopia das células cervicais no exame de

Recebido em 08/03/2007

Aprovado em 30/01/2009

Trabalho realizado na Universidade Federal de Santa Catarina

¹Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Farmácia - UFSC

²Médico do Hospital de Guarnição de Florianópolis - SC

³Aluna do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina

⁴Professora do Curso de Medicina, Departamento de Patologia - Universidade Federal de Santa Catarina

⁵Professora do curso de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas - Universidade Federal de Santa Catarina

Papanicolaou é o melhor método para classificar o carcinoma cervical e a pré-neoplasia, embora a completa e precisa avaliação necessite da natureza da neoplasia necessite dos três métodos de investigação: exame citológico, histologia e colposcopia e atualmente mais um método muito importante de grande precisão: a biologia molecular. Entretanto o diagnóstico geralmente é sugerido pela citologia que deve ser confirmada⁴.

A biopsia da amostra cervical é dependente de uma amostra adequada para uma correta interpretação. Em circunstâncias ideais, a qualificação da neoplasia intraepitelial cervical pode ser feita usando-se os três métodos e obter o mesmo resultado⁵. No entanto a discrepância dos resultados nos três métodos implica em um tratamento prejudicado.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as discrepâncias observadas nos exames colposcópicos, citológicos e histológicos em um caso de micro-lesão cervical.

MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo de acompanhamento de uma paciente do Hospital de Guaranição de Florianópolis do Estado de Santa Catarina com lesão cervical uterina que apresentou discrepâncias entre os diferentes métodos diagnósticos de câncer uterino. Esse estudo foi realizado em colaboração com Hospital de Guaranição de Florianópolis, Instituto de Diagnóstico Anátomo Patológico Florianópolis e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Esse estudo é integrante do projeto Estudo Citomorfológico de Lesões do Colo Uterino – Análise comparativa de diversas metodologias, aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC em 29 de setembro de 2003.

Paciente do sexo feminino, casada, 31 anos de idade; faz acompanhamento médico-ginecológico desde o início de sua vida sexual aos 18 anos de idade. Os autores revisaram o prontuário médico da paciente com atenção especial aos dados clínicos e exames complementares (exame colposcópico, exame citológico de raspado cervical uterino, exame histológico cervical uterino e biologia molecular para HPV de raspado cervical).

Procedimentos Diagnósticos

O Diagnóstico Colposcópico foi realizado durante o exame clínico com lente de aumento e impregnação do colo uterino com ácido acético e iodo (Teste de Shiller).

O Diagnóstico Citológico foi realizado com amostra de raspado cervical uterino e submetido à Coloração de Papanicolaou.

O Diagnóstico Histopatológico foi realizado com biópsia dirigida coletada durante a colposcopia e os cortes foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

Descrição do Caso

1ª Avaliação- Aos 20 anos de idade apresentou lesões iodo-claras em colo uterino, e foi adotada conduta de acompanhamento.

2ª Avaliação- Aos 30 anos de idade compareceu para exames citológicos de rotina e obteve resultado de citologia LSIL-NIC I, colposcopia iodo positivo, Shiller negativo, ausência de lesões aceto-brancas e vasos atípicos, e conduta clínica de seguimento com teste de captura híbrida – HPV, apresentou resultado positivo para HPV grupo B de alto risco – entre os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59 e 68; dentre estes estão 99% dos tipos de papiloma

oncogênicos. Quantificação da carga viral 163,36 (valor de referência < 1.0). Iniciou-se tratamento com ciclo de ácido tricloroacético (TCA) 85% semanal.

3ª Avaliação- Após 6 meses a paciente retorna para consulta de acompanhamento obtendo resultado citológico de NIC II, colposcopia apresenta lesões aceto-brancas e mosaico, histopatologia com resultado de cervicite crônica.

4ª Avaliação- Após 1 mês retorna para consulta de acompanhamento com resultado de citologia inflamatório acentuado, colposcopia – ausência de lesões aceto-brancas.

5ª Avaliação- Após 6 meses – citologia com resultado ASCUS; e conduta clínica de repetição do tratamento com ácido tricloroacético 85%; histopatologia com resultado NIC I/HPV.

6ª Avaliação- Após 6 meses – citologia – NIC II, colposcopia demonstrando lesões aceto-brancas, procede-se nova coleta para captura híbrida para HPV com resultado de 89% grupo B, e histologia com resultado de NIC II.

7ª Avaliação- Após 4 meses retorna para consulta para seguimento pré-cirúrgico e nova coleta de citologia com resultado NIC III/HSIL.

8ª Avaliação- Seguimento com conização e resultado anátomo-patológico da peça – HSIL/NIC III com adendo ao laudo de que as alterações eram retidas em pequeno ponto da peça.

DISCUSSÃO

O interesse atual pelo HPV denota, sobretudo dos trabalhos pioneiros de Koss⁶, em 1989, em fazer o diagnóstico precoce ou levantar a suspeita de infecção pelo HPV.

A presença do “papilomavírus humano” (HPV), principalmente dos tipos 16 e 18, está intimamente ligada ao aparecimento e desenvolvimento do câncer de colo uterino e para que este se desenvolva é necessário não somente a presença do vírus, mas, alta carga viral, persistência da infecção, fatores imunológicos, hormonais e comportamentais⁷.

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta as células ativas para se estabelecer no epitélio, esta infecção pode se tornar latente, na qual o DNA exposto reside no núcleo e a replicação viral fica ligada ao ciclo celular, e as células infectadas têm aparência normal⁸.

Esta infecção latente pode converter-se em infecção ativa por mecanismos ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a imunodepressão fisiológica ou patológica pode levar a este quadro. Quando inicia um estado replicativo, poucos vírus são encontrados nas células basais e parabasais, mas o número de partículas virais aumenta progressivamente quando o processo de maturação celular ocorre, até que, na superfície epitelial, o núcleo é substituído em grande parte pelas partículas do virion completo⁹.

A doença ativamente revelada resultará numa expressão morfológica em células escamosas diferenciadas. Ocorre uma pronunciada alteração no crescimento da camada basal, replicação nas camadas intermediárias e manifestação de efeitos citopáticos virais nas células superficiais e, campos subclínicos de acetobranqueamento que contem graus variados de displasia ou formação de papilas macroscopicamente aparentes⁹.

As principais alterações que caracterizam a Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) incluem mudanças na organização dentro do epitélio e na citomorfolgia das células. Essas mudanças parecem ser iniciadas pela infecção por HPV e representam efeitos citopáticos do vírus em seu ciclo reprodutor, demonstrando presença de coilocito¹⁰.

A presença de células atípicas superficiais e intermediárias discarióticas no esfregaço significa que existe esfoliação da lesão na qual a diferenciação está preservada, determinan-

do uma lesão de baixo grau. Enquanto que, quando surgem na superfície epitelial do esfregaço células basais atípicas discarióticas, significam que existe uma diferenciação celular desordenada, caracterizando uma lesão de alto grau¹¹. Colposcopicamente, o epitélio escamoso antes da aplicação do ácido acético é translúcido, normal, reflete o tecido conjuntivo vascular subjacente. Uma vez que o ácido acético é aplicado e a coagulação das proteínas celulares ocorre, o epitélio escamoso torna-se progressivamente opaco, desenvolvendo principalmente uma aparência plana e opaca que mascara o reflexo do tecido conjuntivo subjacente, como o encontrado nas lesões NIC de alto grau, então a opacidade é grande e a lesão torna-se progressivamente mais branca. Pelo fato de faltar glicogênio neste tecido, a aplicação de iodo resultará em uma área cada vez mais branca dentro do epitélio; isto forma a base para o teste de iodo ou Shiller¹⁰.

No epitélio normal há uma quantidade mínima de proteína e uma grande quantidade de glicogênio, especialmente dentro do citoplasma, enquanto que no epitélio anormal ou atípico existe proteína na membrana celular, núcleos e citoplasma, mas muito pouco glicogênio. Nessas lesões com quantidade menores de glicogênio mas com pequenas elevações de proteínas, como é encontrado nas lesões NIC de baixo grau, o ácido acético produzirá apenas uma leve brancura e opacidade no epitélio. Assim, a aplicação do iodo mostrará uma coloração fraca e desigual¹².

SINGER e MONAGHAN¹⁰ em 2002, relatam que em vários estudos sobre a história natural das NIC, o espectro de regressão das NIC I chega a um índice de 60% e enfatiza a necessidade de além dos métodos morfológicos a necessidade de outros fatores para determinar o prognóstico individual de cada paciente. Já as NIC de alto grau devem ser tratadas, pois estas lesões são precursoras de câncer invasivo, e se, não tratadas, podem progredir para a invasão em mais de 50% dos casos¹¹.

Em muitos casos, no entanto, existe uma falta de correlação entre os métodos diagnósticos, pois muitas vezes existe uma lesão de alto grau que é pequena e somente pode ser devidamente identificada através de colposcopia meticulosa com biópsia dirigida¹⁰.

O objetivo principal dos esfregaços cervicais não é somente diagnosticar o câncer clínico, como também detectar pequenos carcinomas ocultos e anormalidades pré-cancerosas, que podem levar ao câncer invasivo⁶.

Na necessidade de solicitar uma nova coleta é singularmente difícil manter a reprodutibilidade do diagnóstico citológico, seja para confirmar os resultados anteriores seja para esclarecer o diagnóstico em casos atípicos. A segunda amostra pode ser completamente negativa em aproximadamente 60% dos casos com lesões neoplásicas significativas⁶.

O caso clínico em questão, com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical, apresentou citologia negativa, ou inflamatória apenas na quarta avaliação. Provavelmente essa discordância é devida ao intervalo de um mês entre as coletas. A literatura refere que um intervalo muito próximo entre as coletas pode resultar em um falso negativo¹³.

No caso em estudo a lesão de alto grau, embora pequena, foi detectada principalmente porque a citologia, repetidamente demonstrava alterações. A citologia faz parte da tríade diagnóstica (colposcopia, citologia, histologia), e neste caso demonstrou ser o método de rastreamento mais conveniente, rápido, econômico, sensível e de ampla análise de toda a área do colo uterino.

Nos casos de lesão mínima ou micro-lesão o processo desenvolve-se no sentido vertical no tecido, dificultando

sua visualização na análise colposcópica, invariavelmente a coleta de material para análise histológica pode ser obtida de um foco fora da lesão, provocando discordância com o resultado da citologia, onde a coleta é mais abrangente e a possibilidade de obtenção de material da lesão é maior¹⁴. Loreto *et al*, 1997, demonstrou em seus estudos a importância da correlação cito-histológica para o diagnóstico das lesões do colo uterino e, que um dos fatores de discrepância diagnóstica é a coleta de material.

Apesar da necessidade de material histológico para estabelecer o diagnóstico definitivo, esta situação ideal nem sempre é alcançada através de biópsia dirigida devido a ocasional impossibilidade de se detectar colposcopicamente áreas representativas da real lesão que acomete o colo¹⁴.

No caso analisado as várias discordâncias encontradas nos resultados das diferentes metodologias empregadas, resultaram em um agravamento do quadro, que somente quando evoluiu para HSIL foi definitivamente diagnosticado. Observou-se que mesmo empregando-se protocolo de tratamento adequado inicialmente para sanar a lesão, não se obteve as respostas esperadas, necessitando finalmente de uma intervenção mais agressiva, com a conização.

Salientamos, entretanto que a paciente somente prosseguiu com acompanhamento semestral devido à citologia repetidamente mostrar alterações e, portanto caracterizar um quadro de acompanhamento clínico. Quando o quadro definiu-se e pode ser detectados colposcopicamente e histologicamente a lesão já estava em uma fase mais avançada, embora ainda proporcionando condutas adequadas, evitando que a lesão prosseguisse culminando em um carcinoma invasivo.

SINGER e MONAGHAN¹⁰, em 2002, comentam que desde as observações de DONNÉ em 1938, vem-se buscando o reconhecimento de que a citologia constitui método auxiliar infalível no diagnóstico de alterações fisiológicas e patológicas do colo uterino. Ainda nos dias atuais a concordância dos diversos diagnósticos é assunto de estudo, Bondan Tuon⁴, em 2002, em estudo com 80 pacientes, em Curitiba, com diversos graus de lesão cervical, mostrou que, o exame citológico apresentou alta especificidade enquanto que o exame colposcópico alta sensibilidade e que citologia associada à colposcopia aumentou a acurácia do diagnóstico das lesões precursoras do carcinoma do colo uterino.

A escolha do tratamento a ser utilizado em cada caso deve levar em consideração o tipo de lesão. Segundo Lee⁵, em 1998, é importante estar atento aos achados colposcópicos e também aos relatos citológicos em cada caso investigado devido o resultado de biópsias mal orientadas apresentarem resultados não concordantes. O autor refere que em pacientes com lesão de baixo grau, cerca 5% progride para lesão de alto grau e que recidivas são frequentes mesmo utilizando tratamento adequado⁵.

CONCLUSÃO

Em nosso estudo encontramos discrepâncias na tríade colposcopia-citologia-histologia durante a evolução do quadro. Este é um caso de micro-lesão cervical, onde a biópsia mesmo orientada pela colposcopia não foi totalmente satisfatória, dificultando o exame histológico em algumas etapas do diagnóstico.

A utilização da tríplece diagnóstica colposcopia-citologia-histologia bem como teste de biologia molecular, somados ao acompanhamento constante forneceu abordagem segura e eficaz, evitando a progressão para o câncer cervical uterino invasivo.

REFERÊNCIAS

1. Meisels, A.; Morin, C. Cytopathology of the Uterus. 2 ed. American Society of Clinical Pathology Press . Chicago, 1997.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA. 2005.
3. Minamoto, H; Antonângelo, L.; DA Silva, A. G. P.; Gallo, C. P.; DE Andrade E Silva, F. B.; Fenezelian, S.; Tumour cell and stromal features in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. *Histopathology* 2003; 43, (5): 427-443.
4. Bondan Tuon, F. F.; Bittencourt, M. S.; Panichi, M. A.; Pinto, A. P. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológicos e coloscópicos em relação ao exame histológico na identificação de lesões intraepiteliais cervicais. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2002; 48, (2) : 140-144.
5. Lee, S.S. N.; Collins, R. J.; Pun, T. C., Cheng, D. K. L.; Ngan, H. V. S. Conservatite treatment of low grade equamous intraepithelial lesions (LSIL) of the cervix. *Int. J. Gynecol. Obstet* 1998; 60: 35-40.
6. Koss, L. G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. *JAMA.* 1989; 261: 737-743.
7. Bagarelli, L. B. Oliani, A. H. Infecção por papilomavírus (HPV) e neoplasia do colo uterino. *HB Cient.* 1997; 4, (1): 31-49.
8. Carvalho, J. J. M.; Oyakawa, N. I consenso Brasileiro de HPV. 1 ed. BG Cultural. São Paulo. 2000.
9. Rasbidge, S. A; Nayagam, M. Discordance Between Cytologic and Histologic Reports in Cervical Intraepithelial Neoplasia *Acta Cytol.* 1995; 20, 4.
10. Singer, A.; Monaghan, J. M. Colposcopia – Patologia e Tratamento do Trato Genial Inferior. 2ed. Revinter. Rio de Janeiro, 2002.
11. Groos, G. E.; Barrasso, R. Infecção por Papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV. Artmed. Porto Alegre. 1999.
12. DI Loreto, C.; Maeda, M.Y.S.; Utagawa, M.L.; Filho, A.L.; Alves, V. A. F. – Garantia de qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histopatológica – *Ver. Assoc. Méd. Bras.* 1997; 43, (3):195-198.
13. Villa, L. L.; - Papilomavírus Humano e Câncer do Colo de Útero. *Laes & Haes.* 1995; (97): 60-67.
14. Reis, A. F. F. Valor da citologia e da biópsia dirigida pela colposcopia no diagnóstico das neoplasias cervicais uterinas. *J Bras. Ginecol.* 1992; 102, (5): 163-167.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde, Dep. de Análises Clínicas
CEP. 88010-970 Florianópolis - SC

Tradição com a Qualidade



PNCQ

Controle Externo da Qualidade = Proficiência =

Empresa certificada pela ABNT NBR ISO 9001:2000

Amostras para Controle Interno da Qualidade

Amostras de Controle da Qualidade com Qualidade

Controle Interno da Qualidade em Tempo Real

Assessoria Científica Imediata

Participe!

www.pncq.org.br
pncq@pncq.org.br
(21)2569-6867

Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie

Bacteriological and salivary tests for evaluation of caries risk

Lourdes Botelho Garcia¹, Joice Renata Bulla², Cinthia Regiane Kotaka³, Maria Cristina Bronharo Tognim¹, Celso Luiz Cardoso¹.

RESUMO - Os autores fazem uma breve revisão sobre os testes salivares e bacteriológicos comumente indicados na prática odontológica para avaliar o risco de cárie. São abordados os seguintes tópicos: coleta de saliva estimulada, determinação do fluxo salivar e da capacidade tampão da saliva, contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva. As técnicas de preparo dos reagentes e meios de cultura são incluídas no estudo para facilitar o uso dos testes no laboratório de análises clínicas.

PALAVRAS-CHAVE - Testes salivares, testes bacteriológicos, risco de cárie, lactobacilos, estreptococos do grupo mutans.

SUMMARY - A brief review of the salivary and bacteriological tests usually indicated in dental practice for evaluation of caries risk is presented. The following topics are described: collection of stimulated saliva, salivary buffer capacity and flow rate of saliva, and salivary lactobacilli and mutans streptococci group counts. Techniques of preparation of reagents and culture media are also included, to facilitate the use of tests in clinical laboratories.

KEYWORDS - Salivary tests, bacteriological tests, caries risk, lactobacilli, mutans streptococci group.

INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa, crônica e transmissível, que resulta da perda localizada e progressiva de tecido mineralizado dos dentes afetados, causada pela ação de ácidos produzidos pela fermentação microbiana de carboidratos da dieta (8,16,37,58). Embora a prevalência da cárie tenha diminuído muito nos últimos 20 anos, ela persiste como um grave problema de saúde pública em todo o mundo resultando na principal causa de perda dentária para adultos e crianças (16,44).

A instalação do processo cariogênico resulta da presença de quatro fatores essenciais: o hospedeiro representado pelos dentes e pela saliva, a microbiota da cavidade oral, a dieta e o tempo. A cárie ocorre quando estes fatores de risco interagem em níveis críticos, i.e., um dente suscetível em um paciente colonizado por uma microbiota cariogênica, constituída principalmente por estreptococos do grupo mutans e por lactobacilos, consumindo uma dieta rica em sacarose em um determinado período de tempo (40,43,57,58).

Assim, devido à etiologia multifatorial da cárie, uma combinação de exames, incluindo anamnese, exame clínico, dieta, uso de flúor, testes salivares e bacteriológicos é usada na prática odontológica para avaliar o risco de cárie dos pacientes (7,15,40,44,57). Entre os testes salivares, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva merecem destaque porque são de fácil execução, rápidos, de baixo custo e apresentam uma relação inversa com a experiência de cárie (7,13,34,35,40,44,57). No caso dos testes bacteriológicos, as contagens de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva continuam sendo as técnicas mais indicadas para avaliação do risco de cárie (40,42,47,58).

No Brasil, a falta de divulgação dos testes salivares e bacteriológicos junto aos laboratórios de análises clínicas não estimula a inclusão destes testes na rotina do laboratório de modo a atender a demanda da classe odontológica. Com

objetivo de contribuir para o melhor conhecimento deste assunto em nosso meio, apresentamos uma breve revisão sobre os testes salivares e bacteriológicos indicados na prática odontológica para avaliar o risco de cárie, abordando os seguintes tópicos: coleta da saliva estimulada, medida do fluxo salivar, determinação da capacidade tampão da saliva e contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva. As técnicas de preparo dos reagentes e meios de cultura são incluídas no estudo para facilitar o emprego dos testes no laboratório de análises clínicas.

SALIVA ESTIMULADA

A saliva é o fluido produzido pelas glândulas salivares principais e acessórias da cavidade oral, sendo basicamente constituída de 99,5% de água e de 0,25% de matéria orgânica, principalmente proteínas (12,28). Quando secretada na boca a saliva é enriquecida com células descamadas, leucócitos, anticorpos, microrganismos, restos de alimentos, fluidos do sulco gengival, muco da cavidade nasal e faringe, formando uma película de 10 a 100 µm de espessura, constituindo então a denominada saliva total (12,28,43,53,54).

A saliva desempenha várias funções, incluindo a produção da enzima digestiva amilase, a lubrificação dos tecidos orais que é importante para criar o bolo alimentar e facilitar a deglutição, bem como facilitar a fala. Em relação ao risco de cárie a saliva também exerce um papel relevante, devido as funções de limpeza da cavidade oral, de tamponamento dos ácidos produzidos pelos microrganismos cariogênicos da placa e de remineralização dos dentes (12,28,42,51).

A saliva coletada em repouso, passivamente, sem qualquer movimentação da língua ou dos lábios é chamada de saliva não estimulada. Quando obtida pela mastigação de uma substância inerte, como p.e., parafina, goma de mascar (sem açúcar) ou látex, é denominada de saliva estimulada (12,13,58). Os testes salivares e bacteriológicos geralmente

Recebido em 05/11/2007

Aprovado em 02/02/2009

*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia, Sala 116, Bloco I-90, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Avenida Colombo 5790, Campus Universitário. 87020-900 Maringá, PR, Brasil.

¹Professor do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

²Acadêmica do curso de Odontologia, Departamento de Odontologia da UEM.

³ Professora da Faculdade de Odontologia da Uningá, Maringá, PR, Brasil.

são realizados com a saliva estimulada porque ela apresenta as seguintes vantagens em relação a saliva não estimulada: (i) padronização e facilidade da técnica de coleta; (ii) menor tempo de coleta; (iii) a mastigação remove os microrganismos da placa dentária obtendo-se desta forma um espécime representativo da saliva contaminada (13,45). A coleta da saliva estimulada é feita utilizando-se a seguinte técnica (32,36,40,49,52,58): (i) identificar o frasco de coleta, previamente esterilizado, com os dados do paciente. Nós recomendamos usar para a coleta um tubo de ensaio de 50 mL, graduado, de plástico, com tampa de rosca, de fundo cônico, similares aqueles da marca "Corning" usados para centrifugação; (ii) fornecer ao paciente um pedaço de parafina estéril (cubo com aproximadamente 0,5 a 1 cm); (iii) instruir o paciente para levar a parafina a boca e aguardar que ela atinja a temperatura da boca tornando-se amolecida. A saliva produzida em repouso, durante este período, é deglutida; (iv) orientar o paciente para estimular a produção da saliva pela mastigação da parafina durante 5 minutos. Pedir ao paciente para movimentar a parafina na boca, de forma que todos os dentes sejam utilizados na mastigação. A medida que a saliva for sendo produzida, coletá-la. Durante a coleta, o paciente deve ter o cuidado de não colocar a parafina no frasco com a saliva. Ao final da coleta, o paciente deve desprezar a parafina no lixo.

Os testes salivares devem ser feitos imediatamente após a coleta (13). Os testes bacteriológicos podem ser realizados até 24 horas após a coleta desde que a saliva seja mantida em refrigeração a 4°C. A amostra de saliva pode ser coletada pela manhã antes do paciente comer, beber ou escovar os dentes ou após duas horas da ingestão de alimentos para evitar a interferência dos produtos da digestão nos resultados dos testes (36,49).

FLUXO SALIVAR

A velocidade de secreção da saliva pelas glândulas salivares na cavidade oral é denominada de fluxo salivar. Indivíduos normais apresentam um fluxo salivar de 1 a 2 mililitros de saliva estimulada por minuto. O fluxo salivar é responsável pela limpeza das superfícies orais e pelo transporte de microrganismos e restos alimentares que são deglutidos (12,22,40,53,54).

A secreção salivar produzida em repouso ou estimulada é menor na mulher do que no homem devido ao menor tamanho das glândulas salivares femininas (2,18,23). O fluxo salivar não apresenta correlação com a idade (2), porém, depende da saúde geral, de medicamentos e de fatores alimentares. Tensão nervosa e desidratação reduzem a secreção e dificulta a realização dos testes salivares exigindo-se uma cuidadosa padronização da coleta da amostra de saliva (14).

O fluxo salivar deve ser avaliado no início e durante o tratamento de cárie e como parte dos procedimentos de diagnóstico na suspeita de hipossalivação causada, p.e., pela síndrome de Sjögren ou pela irradiação na região de cabeça e pescoço (42,54).

A determinação do fluxo salivar é feita diretamente pela leitura do volume total de saliva estimulada do paciente obtida em cinco minutos. O resultado final é expresso em mililitros de saliva estimulada produzida por minuto (mL/min). A interpretação dos resultados é realizada de acordo com os seguintes parâmetros (42,58): (i) fluxo salivar normal: 1-2 mL/min (adultos); (ii) fluxo salivar baixo: inferior a 0,7 mL/min; (iii) xerostomia: inferior a 0,1 mL/min.

CAPACIDADE TAMPÃO DA SALIVA

A capacidade tampão da saliva é, por definição, a propriedade da saliva total em manter o pH dos fluidos orais constante (43). Trata-se de um importante mecanismo de defesa contra a cárie (17,23), porque neutraliza a produção de ácidos formados pela placa bacteriana (13) evitando assim a desmineralização do esmalte e a formação de cárie (51,54). Apresenta, ainda, uma relação direta com o fluxo salivar, isto é, uma redução no fluxo salivar resulta em uma diminuição do efeito tamponante da saliva (2,12,14,18,23,31,50,51).

O método considerado padrão para determinar a capacidade tampão da saliva é a titulação sob pressão parcial de gás carbônico. Apesar de acurado, a titulação é um procedimento laborioso que por exigir equipamento especial fica restrito a laboratório especializado (17). A clássica adaptação desta técnica para uso clínico, descrita por Ericsson (13), consiste na mistura de 1 mL de saliva estimulada com 3 mL de ácido clorídrico 0,005 N. Uma gota de álcool caprílico ou octílico é adicionada para evitar a formação de espuma. A seguir, borbulha-se lentamente uma corrente de ar sobre a mistura durante 20 minutos para eliminar o gás carbônico. A capacidade tampão é expressa pela leitura em potenciômetro do pH final da mistura saliva-ácido. Para uma faixa de pH entre 3 a 9, Ericsson (13) encontrou uma correlação linear ($r = 0,96$) entre o seu método e a técnica padrão por titulação. É importante salientar que os testes foram realizados imediatamente após a coleta. O armazenamento das amostras de saliva, mesmo em refrigerador, altera os resultados aumentando os valores da capacidade tampão (13).

Uma simplificação da técnica de Ericsson é a eliminação da etapa de borbulhamento de ar. Assim, o tubo contendo a mistura saliva-ácido é agitado e deixado em repouso sem tampa durante 10 minutos para a eliminação do gás carbônico. A leitura do pH final é feita com auxílio de potenciômetro ou papel indicador de pH (29,31,42,49,57,58).

Frostell (17) desenvolveu um teste colorimétrico, comercializado com o nome de "Dentobuff®" (Orion Diagnostica Ltd., Helsinki, Finlândia), para determinar a capacidade tampão da saliva. O teste é realizado inoculando-se, com auxílio de uma seringa estéril descartável, 1 mL de saliva estimulada pela mastigação com parafina em um frasco do tipo penicilina contendo ácido clorídrico e um sistema indicador de pH. O frasco é agitado vigorosamente por 10 segundos e a seguir é deixado em repouso por 2 a 5 minutos, sem a tampa de borracha para a eliminação do gás carbônico. A cor que aparece no frasco é comparada visualmente com uma escala colorida graduada em unidades de pH, fornecida pelo fabricante. A leitura do teste é feita com base nos seguintes parâmetros: (i) capacidade tampão muito baixa ou baixa, pH 3,0 a 4,0; (ii) capacidade tampão intermediária, pH 4,5 a 5,0; (iii) capacidade tampão normal ou boa, pH igual ou superior a 5,5.

Uma simplificação do "Dentobuff®" foi descrita por Ericson & Bratthall (15). O teste, denominado "Dentobuff Strip®" (Orion Diagnostica), consiste basicamente em depositar uma gota de saliva estimulada sobre a superfície reativa de uma fita indicadora de pH impregnada com ácido clorídrico. Após 5 minutos a cor é comparada com uma escala colorida de pH, fornecida pelo fabricante. A leitura do teste é feita de acordo com os seguintes parâmetros: (i) capacidade tampão baixa, pH final $\leq 4,0$; (ii) capacidade tampão média, pH de 4,5 a 5,5; (iii) capacidade tampão normal ou boa, pH $\geq 6,0$.

A determinação da capacidade tampão da saliva pode ser feita de forma artesanal no laboratório utilizando-se a seguinte técnica (31,52,57,58): Identificar com os dados do paciente, um tubo de ensaio 16 x 150 mm com tampa de rosca contendo 3 mL de ácido clorídrico 0,005 N. Homogeneizar a saliva durante 15 segundos em agitador de tubos do tipo "mixer" e transferir 1 mL da saliva para o tubo contendo o ácido clorídrico. Fechar o tubo. Homogeneizar a mistura cinco vezes por inversão do tubo. Retirar a tampa do tubo e deixá-lo em uma estante a temperatura ambiente durante 2 a 5 minutos para a eliminação do gás carbônico. Com auxílio de bastão de vidro ou pipeta, depositar uma gota da mistura saliva-ácido clorídrico sobre a área de teste do papel indicador de pH. A leitura é feita imediatamente comparando-se a cor desenvolvida no papel indicador com a escala padrão de cor fornecida pelo fabricante. Os resultados são interpretados de acordo com os seguintes parâmetros (57,58): (i) capacidade tampão normal: pH \geq 5,0; (ii) capacidade tampão intermediária: pH em torno de 4,5; (iii) capacidade tampão muito baixa: pH \leq 4,0.

LACTOBACILOS

O gênero *Lactobacillus*, constituído por 44 espécies, é representado por bacilos Gram-positivos, não esporulados, com 0,5 a 1,2 μ m de largura por 1 a 10 μ m de comprimento. As células geralmente se apresentam na forma de bacilos longos, algumas vezes cocóides, comumente formando curtas cadeias. São anaeróbios facultativos, às vezes microaerófilos, crescem com dificuldade na presença do ar atmosférico e melhor em tensão reduzida de oxigênio, sendo alguns anaeróbios no isolamento primário. O crescimento geralmente é favorecido em atmosfera de 5% de gás carbônico. São quimiorganotróficos, nutricionalmente exigentes, requerendo meios enriquecidos e complexos para crescimento. Em ágar nutriente apresentam colônias circulares, com diâmetro de 2 a 5 mm, convexas, opacas e sem pigmento. O metabolismo é fermentativo com produção de ácido láctico. Os lactobacilos não reduzem nitrato, não liquefazem a gelatina e são catalase e citocromo oxidase negativas. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 40°C. Estão largamente distribuídos no ambiente e fazem parte da microbiota do trato gastrintestinal e da vagina de mamíferos. Raramente são patogênicos (25).

Os lactobacilos representam aproximadamente 1% da microbiota oral cultivável, sendo *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* e *L. buchneri* as espécies mais freqüentemente encontradas na cavidade oral (28,55). Além de acidogênicos, isto é, de produzirem ácidos pela fermentação de carboidratos, os lactobacilos são também considerados acidúricos porque, ao contrário de outros microrganismos orais, sobrevivem na presença dos ácidos formados na placa bacteriana. Essas propriedades são importantes na participação dos lactobacilos na cárie dentária e explicam a longa sobrevivência destes microrganismos na dentina cariada (55). A determinação do número de lactobacilos da saliva estimulada foi o primeiro método usado em bacteriologia para avaliar o risco de cárie (8).

Rodriguez (45) descreveu um método para a quantificação de lactobacilos da saliva baseado na técnica convencional de contagem de colônias em placas. Amostras de saliva estimulada foram diluídas em caldo glicosado e semeadas na superfície de ágar nutriente contendo 10% de soro de cavalo. As placas foram incubadas na estufa a 37,5°C, em atmosfera de anaerobiose contendo 10% de gás carbônico,

durante dois a três dias. As colônias dos lactobacilos foram facilmente diferenciadas dos outros microrganismos orais pelo maior tamanho e pela presença de um halo opaco em volta da colônia.

Hadley (21), utilizando o ágar tomate peptona modificado, descreveu um método para estimar o número de microrganismos acidogênicos e acidúricos na saliva. Apesar deste meio apresentar um pH em torno de cinco que favorece o crescimento de lactobacilos, não foi totalmente seletivo permitindo o crescimento de outros microrganismos, tais como, leveduras, micrococos, estreptococos, bacilos Gram-negativos e bacilos esporulados (10,46,48).

Em 1951, Rogosa e colaboradores (46) propuseram um meio mais aprimorado para a contagem de lactobacilos denominado meio seletivo para lactobacilos, ou meio SL Rogosa, substituindo com vantagem o ágar tomate peptona. O baixo pH (5,4) e a alta concentração de acetato inibem o crescimento de outros microrganismos orais, com exceção dos lactobacilos que praticamente não são afetados (8,11). Em linhas gerais o método descrito por Rogosa *et al.* (46) requer a semeadura por técnica de "pour-plate" em ágar SL Rogosa da saliva estimulada pura e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , incubação na estufa em aerobiose a 37°C por 72 horas e contagem de colônias. A confirmação das colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Lactobacillus* é feita pela coloração de Gram.

Com base no ágar SL Rogosa, Larmas (33) desenvolveu um teste simplificado de cultivo em lâmina, comercializado com o nome de "Dentocult®" (Orion Diagnostica Ltd., Helsinki, Finlândia). Nesta técnica, uma lâmina de plástico de 20 x 50 mm, contendo meio de Rogosa é inoculada com a amostra de saliva estimulada. A lâmina é então recolocada no estojo de plástico e incubada na estufa a 37°C durante quatro dias. A leitura é feita comparando-se a densidade das colônias desenvolvidas na lâmina com um padrão fornecido pelo fabricante. Devido a facilidade de execução, este método é indicado para uso de rotina no consultório odontológico. O resultado do teste pode ser mostrado ao paciente motivando-o a melhorar suas condições de higiene oral e controlar a dieta (5,29,33).

Westergren & Krasse (56) desenvolveram um micrométodo para a contagem de lactobacilos da saliva baseado no método da contagem na gota (6,41). Esta técnica consiste basicamente em semear duas gotas de 25 μ L das diluições 10^{-1} a 10^{-3} da amostra de saliva estimulada na superfície do ágar SL Rogosa. Após a secagem das gotas, uma camada de ágar SL Rogosa fundido e resfriado a 45-50°C, é adicionada a superfície do meio para diminuir a tensão de oxigênio. Após a solidificação do meio, as placas são incubadas na estufa a 37°C, em aerobiose, durante 72 horas.

Em nosso laboratório, realizou-se um estudo comparando as adaptações das técnicas da contagem na gota (6,41,56) e da alça calibrada (24) com o método padrão de contagem em placa de lactobacilos da saliva. Analisamos 30 espécimes de saliva estimulada obtidos de pacientes de alto (n = 20), médio (n = 6) e baixo (n = 4) risco de cárie. Os resultados das contagens obtidos com as técnicas simplificadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas com aqueles obtidos com o método padrão de contagem (9).

Em resumo, a contagem dos lactobacilos da saliva estimulada pode ser realizada no laboratório de análises clínicas utilizando-se os métodos de "pour-plate", da gota ou da alça calibrada. Em todos os métodos, o meio de cultura utilizado é o ágar SL Rogosa. A seguir faremos uma descrição destes métodos, iniciando com a apresentação da fórmula e da técnica de preparo do ágar SL Rogosa.

O ágar SL Rogosa (11,46) possui a seguinte formulação: triptose 10g; extrato de levedura 5g; dextrose 10g; arabinose 5g; sacarose 5g; acetato de sódio 15g; citrato de amônio 2g; fosfato monopotássico 6g; sulfato de magnésio 0,57g; sulfato de manganês 0,12g; sulfato ferroso 0,03g; sorbitan monoleato (tween 80) 1g; ágar-ágar 15g; água destilada 1000 mL. Técnica de preparo: (i) suspender 75g do meio desidratado (Difco ? Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) em 1 litro de água destilada, deixar em repouso por 10 a 15 minutos para encharcar o ágar-ágar; (ii) dissolver o meio em placa aquecedora magnética com agitação constante; (iii) adicionar 1,32 mL de ácido acético glacial e homogeneizar; (iv) ajustar o pH do meio para 5,4 se necessário, usando o seguinte procedimento: (a) com auxílio de pipeta de 10 mL, transferir 10 mL do meio para um bquer de 100 mL. Com um bastão de vidro colocar uma gota do meio liquefeito sobre a área de teste do papel indicador de pH e efetuar a leitura. Ajustar o pH adicionando gota a gota ácido clorídrico 0,1 N à alíquota de 10 mL do meio no bquer. Calcular a quantidade de ácido necessária para acertar o volume do meio a ser preparado. Se o volume de ácido for elevado, utilizar ácido clorídrico 1 N (i.e., ácido clorídrico concentrado 8,7 mL; água destilada q.s.p. 100 mL); (v) reaquecer o meio por dois a três minutos a 90-100°C. Para evitar o extravasamento do meio durante este procedimento, usando luvas de proteção, suspender o frasco da superfície da placa aquecedora de maneira que a barra magnética mantenha a agitação do meio (homogeneização) e a camada de bolhas formada durante a fervura não ultrapasse a metade da capacidade do recipiente; (vi) transferir o meio cuidadosamente para um funil de distribuição e vaziar volumes de 10 e 20 mL para tubos de ensaio 18 x 180 mm previamente esterilizados; (vii) após a solidificação do meio, incubar os tubos na estufa a 37°C durante 24 horas para fazer o controle de esterilidade. Guardar os tubos em refrigerador a 4-8°C; (viii) no momento do uso, fundir o meio em banho-maria fervente e manter os tubos com o meio liquefeito em banho-maria 45-50°C. Observar que o ágar SL Rogosa não é esterilizado na autoclave.

Técnica de "pour-plate" (46): (i) preparar diluições decimais seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) da saliva estimulada a ser examinada misturando 0,2 mL da saliva com 1,8 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,85%) previamente esterilizada e distribuída em tubo de ensaio 13 x 100 mm; (ii) homogeneizar a saliva diluída 1:100 (diluição 10^{-2}) em agitador de tubos tipo "mixer" durante 30 segundos e assepticamente, transferir 0,1 mL para uma placa de Petri 100 x 15 mm (placa 10^{-2}) identificada com os dados do paciente. Repetir o procedimento inoculando 0,1 mL da saliva diluída 1:10 (diluição 10^{-1}) para a placa 10^{-1} e finalmente, adicionar 0,1 mL da saliva pura (não diluída) na placa 10^0 ; (iii) adicionar a cada placa 20 mL de ágar SL Rogosa liquefeito e resfriado em banho-maria a 45-50°C. Homogeneizar o material, cuidadosamente, através de movimentos circulares da placa na superfície da bancada de trabalho; (iv) após a solidificação do meio (30 minutos), inverter as placas e incubá-las na estufa a 37°C, em aerobiose, durante 72 horas; (v) selecionar para contagem, sempre que possível, a placa que apresentar 30 a 300 colônias. O número encontrado deve ter dois algarismos significativos, caso contrário arredondá-lo. Por exemplo, 82 = 82, 137 = 140, 276 = 280. A seguir, multiplicar o número encontrado por 10 para corrigir o volume para 1,0 mL e depois pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Técnica da contagem na gota (6,9,41,56): (i) usar para cada

teste uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 10 mL de ágar SL Rogosa; (ii) identificar a placa com os dados do paciente; (iii) com auxílio de marcador para retroprojeto, dividir o fundo externo da placa em três partes; (iv) homogeneizar a amostra de saliva estimulada durante 30 segundos em agitador de tubos ("mixer") e preparar diluições decimais seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) misturando 0,2 mL da saliva com 1,8 mL de solução salina estéril previamente distribuída em tubos de ensaio 13 x 100 mm; (v) semear duas gotas de 20 μ L da saliva pura na primeira parte da placa. Repetir o procedimento semeando duas gotas de 20 μ L da diluição 10^{-1} na segunda parte e 20 μ L da diluição 10^{-2} na terceira parte da placa; (vi) após a secagem do inóculo, adicionar a superfície do meio semeado 10 mL de ágar SL Rogosa, liquefeito e resfriado em banho-maria a 45-50°C. Após a solidificação da camada do meio adicionado, incubar a placa na estufa a 37°C, em aerobiose, durante 72 horas; (vii) a contagem de colônias é feita, sempre que possível, a partir da diluição que apresentar entre 6 a 60 UFC/gota. A confirmação dos lactobacilos é feita pela observação das características morfotintoriais, utilizando-se a coloração de Gram (4), de uma a duas colônias representativas de cada placa. O resultado é calculado pela média aritmética das duas contagens selecionadas, multiplicado por 50 (fator de correção para 1 mL) e multiplicado pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em UFC/mL.

Técnica da alça calibrada (9,24): (i) usar para cada teste uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 10 mL de ágar SL Rogosa; (ii) identificar a placa com os dados do paciente; (iii) com auxílio de marcador para retroprojeto, dividir o fundo externo da placa em duas partes iguais; (iv) com auxílio de uma alça calibrada de 1 μ L, que equivale a uma diluição 10^{-3} , semear a amostra da saliva pura na metade da superfície da placa. Fazer a semeadura quatro vezes, sem recarregar ou flambar a alça, inoculando por estrias nos planos paralelo, perpendicular, diagonais direito e esquerdo em relação ao diâmetro da placa; (v) repetir esta operação na outra metade da placa utilizando, entretanto, uma alça calibrada de 10 μ L (diluição 10^{-2}); (vi) após a secagem do inóculo, adicionar à placa uma camada de 10 mL de Ágar SL Rogosa liquefeito e resfriado em banho-maria a 45-50°C. Após a solidificação da camada do meio adicionado, incubar as placas em aerobiose na estufa a 37°C por 72 horas; (vii) selecionar para contagem, sempre que possível, as diluições que apresentarem entre 15 e 150 colônias. A seguir, multiplicar o número encontrado por 100 (no caso do uso da alça de 10 μ L) ou por 1000 (quando do emprego da alça de 1 μ L) para corrigir o volume para 1 mL. O resultado final é expresso em UFC/mL. Na técnica da alça calibrada, podem ser usadas alças de 1 μ L e 10 μ L, de plástico, descartáveis, encontradas no comércio. As alças podem, também, ser confeccionadas de forma artesanal no laboratório utilizando-se fio de níquel-cromo número 26 Brown & Sharp (BS-26), com diâmetro interno de 1,45 mm para a alça de 1 μ L ou fio BS-19, com 4 mm de diâmetro interno, para a alça de 10 μ L (24). Após a montagem no cabo de Kolle, deixar a alça com 45 a 50 mm de comprimento. Em nosso laboratório, nós temos utilizado com bons resultados, fio de níquel cromo da marca "Nikrothal 80" (Kanthal Brasil Ltda., Diadema, SP, Brasil), constituído da mistura de 80% de níquel e 20% de cromo, que pode ser encontrado em casas de comércio de materiais elétricos.

A interpretação dos resultados da contagem de lactobacilos da saliva estimulada é feita de acordo com os seguintes parâmetros (46,47,58): (i) zero a 1.000 UFC/mL - negativa a ligeira atividade carioca; (ii) acima de 1.000 até 10.000

UFC/mL ? ligeira a moderada atividade cariiosa; (iii) acima de 10.000 até 50.000 UFC/mL - moderada a acentuada atividade cariiosa.

ESTREPTOCOCOS DO GRUPO "MUTANS"

Os estreptococos do grupo mutans constituem um complexo de espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*, estreitamente relacionadas, incluindo as espécies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. downei* e *S. macacae*, distribuídas em oito sorotipos (a-h). Na cavidade oral humana as espécies mais frequentemente encontradas são *S. mutans* e *S. sobrinus* (55).

Os estreptococos do grupo mutans apresentam forma esférica ou ovóide, com 0,5 – 2,0 µm de diâmetro e ocorrem aos pares ou em cadeias, quando cultivados em meio líquido. São microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, porém algumas espécies crescem melhor na presença de 5% de gás carbônico ou em anaerobiose. Requerem meios de cultura ricos em nutrientes e apresentam metabolismo fermentativo, produzindo principalmente ácido láctico. Seu crescimento ótimo ocorre a 37°C, parasitam vertebrados, habitam principalmente a boca e trato respiratório superior. Poucas espécies são patogênicas para o homem e animais (25,55).

Um dos primeiros estudos registrados na literatura sobre o isolamento de *Streptococcus mutans* de lesão cariiosa foi realizado por Clarke em 1924 (8). Em 1944, Chapman formulou um meio de cultivo seletivo para isolamento de estreptococos e enterococos denominado ágar mitis salivarius, constituído basicamente de peptonas, carboidratos e de telurito de potássio e cristal violeta como agentes inibidores de bacilos Gram-negativos e bactérias Gram-positivas, exceto os estreptococos (11).

O método tradicional de contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva foi facilitado na prática bacteriológica com a introdução do ágar mitis salivarius bacitracina (MSB) descrito por Gold *et al.* (19). Neste método, as amostras de saliva pura e diluída 10^{-1} a 10^{-3} , são semeadas na superfície de placas contendo ágar MSB, isto é, ágar mitis salivarius adicionado de 15% de sacarose e de 0,2 unidades/mL de bacitracina. A contagem das colônias é feita após incubação das placas em anaerobiose (95% de nitrogênio e 5% de gás carbônico), na estufa a 37°C, durante 48 horas. O tempo limite de armazenagem do ágar MSB é de uma semana devido à inativação da bacitracina (19).

Uma simplificação deste método foi o micrométodo descrito por Westergren & Krasse (56). A técnica consiste em inocular duas gotas de 25 µL da saliva pura e diluída à 10^{-1} e 10^{-2} na superfície do ágar MSB. Após a secagem das gotas as placas são incubadas na estufa a 37°C, em jarra de anaerobiose contendo 95% de nitrogênio e 5% de gás carbônico, durante 48 horas. Além de ser rápido e econômico, o micrométodo apresenta alta correlação com o método tradicional descrito por Gold *et al.* (19).

Outro método simplificado para estimar o nível de *S. mutans* da saliva foi desenvolvido por Köhler e Bratthall (30). A técnica consiste em girar uma espátula de madeira na boca dez vezes, para molhar com saliva, e pressioná-la imediatamente contra a superfície do ágar MSB distribuído em placas (tipo rodac). As placas são colocadas em sacos plásticos, preenchidos com ar expirado, lacrados e incubados na estufa a 37°C por 48 horas. Os resultados deste método são similares àqueles obtidos com o método convencional descrito por Gold *et al.* (19).

Uma adaptação do método da espátula de madeira, utilizando uma fita de plástico, foi descrita por Jensen e Bratthall (26). Neste método, a fita é girada na boca dez vezes, retirada com os lábios fechados, para remover o excesso de saliva, e transferida para um tubo contendo 6 mL de caldo seletivo. A bacitracina (30µg) preparada anteriormente, em papel de filtro, é acrescentada ao caldo antes do uso. O tubo é incubado a 37°C por 48 horas. Os resultados mostraram concordância de 77% com o método convencional (19) e 80% com o da espátula de madeira (30). A vantagem desta técnica está relacionada ao prazo de validade do teste, uma vez que a bacitracina é adicionada no momento do uso.

Um método semiquantitativo, baseado na capacidade de aderência de *S. mutans* ao vidro foi desenvolvido por Matsukubo e colaboradores (38,39). Neste método, no momento de uso, uma fita de papel de filtro impregnada com agentes seletivos (bacitracina, telurito de potássio e azul de tripan) é introduzida em uma ampola contendo caldo mitis salivarius. Após 10 minutos de imersão, a fita é retirada e inocula-se 0,1 mL da saliva não estimulada a ser examinada. A ampola é fechada com uma tampa de borracha e mantida inclinada, em um ângulo de 60 graus, durante a incubação em aerobiose na estufa a 37°C, por 24 horas. O resultado é avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: (i) -, ausência de colônias aderidas na parede da ampola; (ii) +, 1 a 10 colônias aderidas; (iii) ++, mais de 10 colônias aderidas; (iv) +++, mais de 20 colônias grandes aderidas, além de numerosos pequenos depósitos. Quando o resultado da aderência é de +++ existe equivalência com níveis de *S. mutans* maiores que 10^5 UFC/mL, enquanto + ou - está relacionado com níveis menores que 10^4 UFC/mL. Um resultado ++ indica que o número de *S. mutans* está entre 10^4 e 10^5 UFC/mL de saliva. As vantagens deste método, além da estabilidade da bacitracina que é fornecida na forma desidratada, estão relacionadas ao pequeno volume da amostra de saliva utilizada, ao curto tempo de incubação, ao cultivo em aerobiose e por não necessitar a diluição da saliva. Este teste é comercializado pela Showa Yakuhin Kako Co. Ltd, Tóquio, Japão, para uso em clínicas, programas comunitários e estudos epidemiológicos (38,39,58).

Alaluusua e colaboradores (1) desenvolveram uma técnica de contagem de estreptococos do grupo mutans utilizando uma lâmina de plástico 20 x 50 mm, contendo ágar mitis salivarius. Após a inoculação da saliva estimulada na lâmina, dois discos, com 6 mm de diâmetro, contendo 5 µg de bacitracina são colocados sobre o ágar, observando-se uma distância de 20 mm entre eles. As lâminas são incubadas na estufa a 37°C, por 48 horas, dentro de tubos com tampa de rosca contendo tabletes geradores de gás carbônico. Os resultados mostraram 92% de correlação com a técnica de contagem padrão (19), não havendo diferença significativa no número de colônias encontradas nos dois métodos.

Outro método em lâmina descrito por Jordan e colaboradores (27) originou um "kit", denominado Cariescreen SM® (APO Diagnostics, Inc., Toronto, Canadá), constituído de dois frascos, um com uma lâmina de plástico coberta com ágar modificado sem bacitracina e o segundo com 24 mL de salina para coleta e diluição da saliva estimulada. Imediatamente antes do uso, um tablete com 440 unidades de bacitracina é adicionado ao frasco de coleta. A lâmina é imersa, por poucos segundos, na amostra de saliva diluída, e retornada ao frasco original que contém um tablete gerador de gás carbônico que é então umedecido com duas gotas de água. O frasco é tampado e incubado por 48 horas

a 37°C e mais um dia a temperatura ambiente. Este método mostra boa correlação com o método tradicional de contagem (19), eliminando o problema da instabilidade da bacitracina.

Beighton (3) descreveu um método para a contagem de estreptococos do grupo mutans no qual a coleta da amostra da saliva é feita diretamente do dorso da língua utilizando-se uma alça bacteriológica de 10 µL. O material é imediatamente suspenso em 1 mL de tampão fosfato e volumes de 0,1 mL são semeados, em duplicata, na superfície de ágar MSB. As placas são incubadas na estufa a 37°C, em atmosfera de microaerofilia (10% de gás carbônico), durante 3 a 4 dias.

A técnica da alça calibrada descrita por Hoeprich (24), foi adaptada em nosso laboratório para a contagem de *S. mutans* da saliva (9). Neste método, 1 µL da amostra de saliva estimulada é semeada na metade da superfície de uma placa contendo o ágar MSB, inoculando-se por estrias nos planos paralelo, perpendicular, diagonais direito e esquerdo em relação ao diâmetro da placa. Na outra metade da placa, a operação é repetida com a diluição 10⁻¹ da saliva. As placas são colocadas em jarras de anaerobiose ou em sacos plásticos com ar expirado e incubadas na estufa a 37°C, durante 48 horas (20,30).

No laboratório de análises clínicas, a quantificação de estreptococos do grupo mutans da saliva estimulada pode ser realizada pelo uso dos métodos de contagem padrão, da gota ou da alça calibrada. Em todos os métodos o meio de cultura empregado é o ágar MSB. A seguir faremos uma descrição destes métodos, iniciando com a apresentação da fórmula e da técnica de preparo do ágar MSB.

O ágar MSB apresenta a seguinte fórmula: triptose 10g; proteose peptona (número 3) 5g; dextrose 1g; sacarose 50g; fosfato di-potássico 4g; azul de tripan 0,075g; cristal violeta 0,0008g; ágar-ágar 15g; água destilada 1000 mL. Técnica de preparo: (i) suspender 90g do ágar mitis salivarius (Difco) em 1 litro de água destilada e adicionar 150g de sacarose; (ii) deixar o meio em repouso à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos para encharcar o ágar-ágar; (iii) dissolver o meio em placa aquecedora magnética com agitação constante; (iv) retirar o magneto, acondicionar o frasco e autoclavar a 121°C por 15 minutos; (v) resfriar o meio em banho-maria a 45-50°C e adicionar asepticamente 1 mL de uma solução de telurito de potássio a 1% e 1 mL de uma solução de bacitracina contendo 200 U/mL; (vi) distribuir asepticamente volumes de 15 a 20 mL para placas de Petri 100 x 15 mm; (vii) após a solidificação do meio, incubar as placas na estufa a 37°C durante 24 horas para controle de esterilidade; (viii) o ágar MSB, quando mantido em refrigerador a 4-8°C, deve ser utilizado até sete dias após o preparo devido a inativação da bacitracina.

É importante observar os seguintes cuidados no preparo da solução de bacitracina: (i) pesar o antibiótico, suspender em água gelada e deixar em repouso na geladeira a 4°C para dissolver. Não agitar para não inativar a bacitracina; (ii) esterilizar a solução do antibiótico por filtração em membrana com poro de 0,45 µm de diâmetro (Millipore® - Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Adicionar asepticamente a solução de bacitracina ao ágar MSB, fundido e resfriado a 45-48°C, de forma a obter uma concentração final de 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de meio.

Técnica da contagem padrão em superfície para a contagem de estreptococos mutans da saliva (19): (i) preparar diluições decimais seriadas (10⁻¹ a 10⁻³) da saliva a ser examinada, através da mistura de 0,2 mL da saliva com 1,8 mL de solução salina estéril; (ii) homogeneizar a saliva diluída 1:1000 (diluição 10⁻³) em "mixer" por 30 segundos

e asepticamente com auxílio de uma pipeta de 1 mL, transferir 0,1 mL para uma placa de Petri 100 x 15 mm (placa 10⁻³) contendo ágar MSB. Repetir esta operação, inoculando 0,1 mL da saliva diluída 1:100 (diluição 10⁻²) para a placa 10⁻² e finalmente 0,1 mL da diluição 1:10 para a placa 10⁻¹; (iii) fazer a semeadura na superfície utilizando a própria pipeta. Inocular por estrias nos planos paralelo, perpendicular e diagonal ao diâmetro da placa; (iv) colocar o material em jarra de anaerobiose ventilada, lavar três vezes com nitrogênio e adicionar mistura anaeróbia constituída de 80% de nitrogênio, 10% de gás carbônico e 10% de hidrogênio; (v) Incubar as placas na estufa a 35-37°C, durante 48 horas; (vi) selecionar para contagem, sempre que possível, as placas com 30 a 300 colônias. A seguir, multiplicar o número encontrado por 10 para corrigir o volume para 1 mL e multiplicar pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em UFC/mL.

Técnica da contagem na gota para a enumeração de estreptococos do grupo mutans da saliva (6,9,41,56): (i) usar para cada teste uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 15-20 mL de ágar MSB; (ii) identificar a placa com os dados do paciente; (iii) com auxílio de marcador para retroprojeter, dividir o fundo externo da placa em três partes; (iv) homogeneizar a amostra de saliva estimulada durante 30 segundos em agitador de tubos ("mixer") e preparar diluições decimais seriadas (10⁻¹ a 10⁻³) misturando 0,2 mL da saliva com 1,8 mL de solução salina estéril previamente distribuída em tubos 13 x 100 mm; (v) semear duas gotas de 20 µL da saliva pura na primeira parte da placa. Repetir o procedimento semeando duas gotas de 20 µL da diluição 10⁻¹ na segunda parte e 20 µL da diluição 10⁻² na terceira parte da placa; (vi) após a secagem do inóculo colocar a placa em jarra de anaerobiose ventilada, adicionar a mistura anaeróbia conforme descrito anteriormente na técnica padrão; (vii) Incubar o material na estufa a 35-37°C durante 48 horas. Alternativamente, a placa pode ser incubada em atmosfera de microaerofilia, utilizando-se a técnica do ar expirado em saco plástico (20,30); (viii) selecionar para a contagem, sempre que possível, as gotas com 6 a 60 colônias. A seguir, multiplicar o número encontrado por 50 para corrigir o volume para 1 mL e multiplicar pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em UFC/mL.

Técnica da alça calibrada para a contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva (9,24): (i) usar para cada teste uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 15-20 mL de ágar MSB; (ii) identificar a placa com os dados do paciente; (iii) com auxílio de marcador para retroprojeter, dividir o fundo externo da placa em duas partes iguais; (iv) com auxílio de uma alça calibrada de 1 µL, semear a amostra da saliva pura na metade da superfície da placa (diluição 10⁻³). Fazer a semeadura quatro vezes, sem recarregar ou flambar a alça, inoculando por estrias nos planos paralelo, perpendicular, diagonais direito e esquerdo em relação ao diâmetro da placa; (v) repetir esta operação na outra metade da placa utilizando a saliva diluída 1:10 (diluição final de 10⁻⁴); (vi) após a secagem do inóculo colocar a placa em jarra de anaerobiose ventilada, adicionar a mistura anaeróbia conforme descrito anteriormente na técnica padrão; (vii) Incubar o material na estufa a 35-37°C durante 48 horas. Alternativamente, a placa pode ser incubada em atmosfera de microaerofilia, utilizando-se a técnica do ar expirado em saco plástico (20,30); (viii) selecionar para a contagem, sempre que possível, as diluições que apresentarem entre 15 a 150 colônias. Multiplicar o número encontrado por 1.000 ou 10.000 para corrigir o volume para 1 mL e multiplicar pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em UFC/mL.

A interpretação dos resultados da contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva estimulada é feita com base nos seguintes parâmetros (58): (i) contagens ≤ 250.000 UFC/mL - baixo risco de cárie; (ii) contagens $\geq 1.000.000$ UFC/mL - alto risco de cárie.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes salivares e bacteriológicos descritos neste estudo vêm sendo utilizados, desde 1990, nas aulas práticas do módulo de microbiologia das disciplinas de ciências básicas patológicas e de cariologia I, do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá. Nós temos obtidos bons resultados com o emprego da técnica da alça calibrada para a contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva.

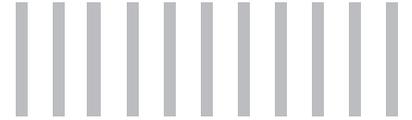
Há alguns anos, a Herpo Produtos Dentários Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) comercializava um "kit" (Sistema Caritest®) para avaliação do fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e detecção dos níveis de *Lactobacillus* e de *Streptococcus mutans* na saliva, que pela simplicidade de execução era indicado para uso no consultório odontológico.

Atualmente, nós não temos conhecimento da disponibilidade no mercado de "kits", fabricados por empresas brasileiras, para a avaliação do risco de cárie. Nós esperamos que o presente estudo possa despertar o interesse e contribuir para a implantação dos testes salivares e bacteriológicos na rotina dos laboratórios de análises clínicas.

REFERÊNCIAS

01. Alaluusua, S.; Savolainen, J.; Tuompo, H. & Gronroos, L. Slide-scoring method for estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *Scand. Dent. J. Res.*, 92: 127-133, 1984.
02. Barentin, I. & Johnson, G. Frequency of low values of stimulated saliva flow rate, Dentobuff® and Dentocult® in routine use. *Swed. Dent. J.*, 10(5): 207-212, 1986.
03. Beightin, D. A simplified procedure for estimating the level of *Streptococcus mutans* in the mouth. *Br. Dent. J.*, 160: 329-330, 1986.
04. Bier, O. *Microbiologia e imunologia*. 23ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1984, p.919-998.
05. Birkhed, D.; Edwardsson, S. & Andersson, H. Comparison among a dip-slide test Dentocult® plate count, and snyder test for estimating number of lactobacilli in human saliva. *J. Dent. Res.*, 60:1832-1841, 1981.
06. Bousfield, I.J., Smith, G.L. & Trueman, R.W. The use of semi-automatic pipettes in the viable counting of bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 36: 297-299, 1973.
07. Bratthall, D. & Carlsson, J. Estado atual dos testes de atividade de cárie. In: Thylstrup, A & Fejerskov, O.? *Tratado de Cariologia* (tradução Weyne, S) Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1988, p. 239-257.
08. Burnett, G.W., Scherp, H.W. & Schuster, G.S. *Microbiologia Oral & Doenças Infeciosas*. 4ª ed. (1ª ed. Brasileira, supervisão de tradução Araújo, W.C.) Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1978, p. 243-326.
09. Cardoso, C.L.; Guerra, A.; Guilhermetti, M.; Tognim, M.C. & Garcia, L.B. Adaptação dos métodos da contagem na gota e da alça calibrada para contagem de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans da saliva. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 35(2): 73-76, 2003.
10. Davies, G.N., King, R.M. & Collins, A.A. The relationship between lactobacillus counts, snyder tests and the subsequent incidence of dental caries. *Arch. Oral Biol.*, 1: 62-73, 1959.
11. *Difco Manual*. 11 ed. Sparks, Difco Laboratories Division of Becton Dickinson and Company, 1998, p.324-326, 433-434.
12. Edgar, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.*, 172: 305-312, 1992.
13. Ericsson, Y. Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta*

- Odontol. Scand.*, 17: 131-165, 1959.
14. Ericsson, Y. & Hardwick, L. Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention. *Caries Res.*, 12 (suppl.1): 94-102, 1978.
15. Ericson, D. & Bratthall, D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. *Scand. J. Dent. Res.*, 97(5): 405-407, 1989.
16. Featherstone, J.D.B. The science and practice of caries prevention. *J. Amer. Dent. Assoc.*, 131: 887-899, 2000.
17. Frostell, G. A colorimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva. *Swed. Dent. J.*, 4(3): 81-86, 1980.
18. Fure, S. & Zickert, I. Root surface caries and associated factors. *Scand. J. Res.*, 98(5): 391-400, 1990.
19. Gold, O.G., Jordan, H.V. & van Houte, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 18, 1357-1364, 1973.
20. Guerra, A., Guilhermetti, M., Tognim, M.C.B. & Cardoso, C.L. Estudo da atmosfera de incubação na enumeração de *S. mutans* da saliva. Resumos dos trabalhos apresentados ao "III Encontro de Iniciação Científica CNPq/UEPG-UEL-UEM", Ponta Grossa, PR; 18-20 de Maio de 1994, p. 60.
21. Hadley, F.P. A quantitative method of estimating bacillus acidophilus in saliva. *J. Dent. Res.*, 13(6): 415-428, 1933.
22. Hall, H.D. Protective and maintenance functions of human saliva. *Quintessence Int.*, 24: 13-16, 1993.
23. Heintze, U., Birkhed, D. & Björn, H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed. Dent. J.*, 7: 227-238, 1983.
24. Hoeprich, P.D. Culture of urine. *J. Lab. Med.*, 56: 57-61, 1960.
25. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. & Williams, S.T. *Bergey's manual® of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994, p. 532-533, 566.
26. Jensen, B. & Bratthall, D. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *J. Dent. Res.*, 68(3): 468-471, 1989.
27. Jordan, H.V.; Laraway, R.; Snirch, R. & Marmel, M. A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 66(1): 57-61, 1987.
28. Jorge, A.O.C. *Microbiologia Bucal*. 2ª ed. São Paulo, Santos Livraria Editora, 1998, p. 66-75.
29. Koga, C.Y.; Unterkircher, C.S.; Fantinato, V.; Shimizu, M.T. & Jorge, A.O.C. Testes de atividade de cárie. Avaliação de diferentes métodos. *R.G.O.*, 43(3): 141-144, 1995.
30. Köhler, B. & Bratthall, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, 9(5): 584-588, 1979.
31. Kotaka, C.R.; Mello, A.C.; Garcia, L.B. & Cardoso, C.L. Avaliação da fita indicadora de pH na determinação da capacidade tampão da saliva. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 33(4): 199-203, 2001.
32. Krasse, B. Risco de cárie. Guia prático para controle e assessoramento. 2ª ed. (tradução de Andrade, J.F.L.) São Paulo, Quintessence Editora Ltda., 1988, p. 41-43.
33. Larmas, M. A new dip-slide method for the counting of salivary lactobacilli. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, 71: 31-35, 1975.
34. Larmas, M. Simple tests for caries susceptibility. *Int. Dent. J.*, 35(2): 109-117, 1985.
35. Larmas, M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int. Dent. J.*, 42(4): 199-208, 1992.
36. Marques, A.L.V., Silva, O.P. & Pellegrino, D. *Microbiologia Oral*. Bauru, Faculdade de Odontologia da USP, 1970, p. 253-259.
37. Marsh, P.D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent. Clin. N. Amer.*, 43(4): 599- 614, 1999.
38. Matsukubo, T.; Ohta, K.; Maki, Y.; Takeuchi, M. & Takazoe, I. A semi-quantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium. *Caries Res.*, 15(1): 40-45, 1981.
39. Matsukubo, T.; Saito, H.; Ohta, K.; Maki, Y.; Sazuka, J.-I.; Takaesu, Y.; Takazoe, I. & Asami, K. A practical method for differentiating the salivary levels of *Streptococcus mutans* using a stabilized broth. *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 24(4): 195-202, 1983.
40. Mayer, M.P. A. Avaliação do risco de cárie. *ABOPREV*, 1(1): 5-11, 1991.
41. Miles, A.A., Misra, S.S. & Irwin, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, 38: 732-749, 1938.



Prezados colegas,

É com alegria que venho convidá-los para mais um grande acontecimento, desta vez na cidade de Porto Alegre, no belo estado do Rio Grande do Sul. Trata-se do 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas (CBAC) que se realizará no período de 14 a 18 de junho de 2009. Estamos nos preparando para que este seja mais um grande sucesso de nossa sociedade.

Durante o congresso, contaremos com palestrantes internacionais e nacionais conceituados, além de empresas renomadas na área laboratorial, com o objetivo de oferecer aos participantes o que há de melhor no mercado. Para este evento, ampliamos nosso objetivo de capacitar e atualizar o profissional da área laboratorial; também, estamos conversando com os expositores para que ampliem suas ofertas de bons negócios. Acreditamos que assim realizaremos um evento que atenda às necessidades atuais de todos.

A programação está bem elaborada, com 95 eventos, dentre mesas-redondas, workshops, conferências, mini-cursos pré congresso e muito mais. Toda essa organização é para que você desfrute do que há de mais novo no mercado e possa se atualizar de uma forma melhor e mais completa, seja estudante ou profissional.

Por isso mesmo, estamos realizando em conjunto, o 4º Encontro Ibero Mercosul de Gestão de Qualidade em Estabelecimentos de Saúde. Dando assim ao 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas o perfil internacional que Porto Alegre merece, pela importância que tem no cenário nacional da área laboratorial.

Aproveite também para fazer passeios encantadores que a cidade oferece. Sem dúvida, esta é uma boa oportunidade para visitar a Serra Gaúcha e outras localidades com as maravilhas de uma colonização européia na arquitetura, gastronomia e vestuário.

E na grande festa do conhecimento, você é nosso grande convidado.

Este será, sem a menor dúvida, mais um grande congresso realizado pela SBAC para você.

Garanta já a sua inscrição, e nos veremos lá.

Um abraço,

Ulisses Tuma
Presidente da SBAC

Lúpus eritematoso sistêmico (les): perfil clínico-laboratorial dos pacientes atendidos em um serviço privado de reumatologia na cidade de Santo Ângelo-RS

Systemic lupus erythematosus (sle): clinical and laboratory profile of patients followed at a private rheumatology clinic in Santo Ângelo-RS

Ricardo de Mattos Dutra¹ & Tiago Bittencourt de Oliveira^{2*}

RESUMO - O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória de caráter auto-imune que acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva. O objetivo deste estudo foi verificar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes atendidos em um serviço privado de reumatologia na cidade de Santo Ângelo-RS. Foi realizado um estudo observacional retrospectivo e transversal. As variáveis analisadas foram: sexo, idade, tempo de diagnóstico, sintomas clínicos, pesquisa de fator antinuclear (FAN), pesquisa de anticorpos anti-DNA e as complicações relacionadas à doença. Foram analisados 17 prontuários médicos, dos quais apenas 1 (5,9%) era do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de 35,4 anos e o tempo de diagnóstico da doença foi de 62,9 meses, os sintomas mais frequentes foram artralgia 12 (70,6%) e eritema cutâneo 8 (47,8%) e as complicações clínicas encontradas foram artrite 11 (64,7%), nefrite 6 (35,3%), vasculite 3 (17,65%) e diabetes 2 (11,8%). Os padrões de imunofluorescência indireta mais encontrados foram o nuclear homogêneo 3 (25%) e nuclear pontilhado fino 3 (25%). O LES apresentou-se como sendo uma doença predominantemente do sexo feminino e com achados clínicos clássicos como a presença eritema cutâneo e comprometimento articular entre os mais frequentes.

PALAVRAS-CHAVE - Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), manifestações clínicas, complicações clínicas, autoimunidade.

SUMMARY - Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease that affects mainly women in reproductive age, the signs of SLE vary between periods of both illness and wellness. The aim of this study was to verify the clinical and laboratory profile of patients followed at a private Rheumatology Clinic in Santo Ângelo-RS. A transversal retrospective study were performed. The following variables were considered in the study: sex, age, time of diagnosis, Anti-Nuclear Antibodies (ANA blood test) and antibody anti-DNA tests, as well as routine laboratory exams and other symptoms related to the illness. Seventeen patient's data had been analyzed, of which only 1 (5.9%) was male, the average age of the patient was of 35,4 years old and 62,9 months of diagnosis time. The most frequent symptoms were arthralgia 12 (70.6%), skin rash 8 (47.8%) and the clinical manifestations were arthritis 11 (64.7%), nephritis 6 (35.3%), vasculitis 3 (17.65%) and diabetes 2 (11.8%). The most frequent patterns of indirect immunofluorescence found were homogeneous nuclear 3 (25%) and speckled nuclear 3 (25%). The systemic lupus erythematosus (SLE) was confirmed as being predominantly a female disease with classic clinical symptoms as skin rash and joint pains among the most important evidences for diagnosis.

KEYWORDS - Systemic Lupus Erythematosus (SLE), clinical manifestations, clinic complications, autoimmune.

INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica, remitente e recidivante, caracterizada principalmente por lesões na pele, articulações, rim e membranas serosas, sendo considerada o protótipo clássico da doença multissistêmica de origem auto-imune caracterizada por uma gama de auto-anticorpos no soro do paciente (QUEIROZ *et al.*, 2003; KOSMINSKY *et al.*, 2006).

A etiologia do LES ainda não está totalmente definida, mas alguns fatores importantes compreendem fatores endócrino-metabólicos, ambientais e genéticos. Os achados em pacientes com LES, sugerem alguma perturbação fundamental do sistema imune. As evidências de alguma desordem hormonal baseiam-se principalmente na observação de que o LES é mais frequente em mulheres em idade fértil (GORDON, 2001; LIMA *et al.*, 2005; KLEJNBERG & MORAES, 2005; KOSMINSKY *et al.*, 2006).

O LES é uma doença razoavelmente comum, com uma prevalência que pode atingir 1 a cada 10.000 habitantes, ou até 1 a cada 2.500 em determinadas populações. À semelhança da maioria das doenças auto-imunes, o LES é pre-

dominantemente uma doença feminina, com uma frequência de 1 para cada 700 mulheres em idade fértil e uma proporção entre os sexos feminino e masculino de 9:1 respectivamente (ROCHA *et al.*, 2000; GORDON, 2001; COSTA *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005; KOSMINSKY *et al.*, 2006).

O LES é uma doença auto-imune do tecido conjuntivo que reúne manifestações articulares e cutâneas ou multissistêmica, podendo apresentar exuberância de auto-anticorpos. As lesões cutâneas do LES são polimorfas e podem ser específicas ou inespecíficas. A diversidade de manifestações clínicas da doença reflete-se no amplo espectro de achados laboratoriais (GORDON, 2001; CAMARGO & OLIVEIRA, 2005; LIMA *et al.*, 2005).

Os pacientes com LES podem apresentar uma série de anormalidades, inclusive artrite e artralgias, lesões cutâneas, nefrite, manifestações no sistema nervoso central, fenômeno de Raynald, pleurite, pericardite, anemia hemolítica e trombocitopenia. Sintomas não específicos como febre, alopecia, fadiga, e perda de peso afetam quase todos os pacientes lúpicos (QUEIROZ *et al.*, 2003; KLEJNBERG & MORAES, 2005; CAZNOCH *et al.*, 2006).

Recebido em 15/10/07

Aprovado em 03/01/09

¹Graduando do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus Santo Ângelo/RS.

²Professor Mestre das disciplinas de Imunologia Clínica e básica, do Curso de Farmácia, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões – URI Campus Santo Ângelo/RS (Responsável pela publicação)

As lesões cutâneas do LES incluem uma série de lesões, especialmente nas áreas expostas ao sol. Em mais de 50% dos pacientes ocorre fotossensibilidade, resultando em erupções cutâneas após exposição à luz UVB (ROCHA *et al.*, 2000; KOSMINSKY *et al.*, 2006).

O comprometimento renal constitui uma das mais graves manifestações do LES. Essas anormalidades vão desde mínimos traços de proteinúria e de alguns cilindros hemáticos até a hematúria maciça, proteinúria e síndrome nefrótica manifesta (ROCHA *et al.*, 2000; GORDON, 2001; KOSMINSKY *et al.*, 2006).

O LES possui uma prevalência que não a torna rara em nosso meio, com sintomas que a confundem com outras patologias, muitas vezes acaba sendo tratada erroneamente. Nesse sentido, este trabalho se propôs a avaliar o perfil clínico-laboratorial dos pacientes com LES de um serviço privado de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional, retrospectivo e transversal em uma clínica de reumatologia na cidade de Santo Ângelo RS, a qual situa-se no noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, ocupando uma área de 681 Km², com uma população estimada de 80.117 habitantes. Foram analisados os prontuários médicos de 17 pacientes ambulatoriais diagnosticados com LES, que realizaram consulta médica durante o período de janeiro de 2003 à maio de 2007. As amostras foram constituídas pelos prontuários médicos dos pacientes acompanhados no serviço de reumatologia. Foram verificadas as seguintes variáveis: sexo, idade, tempo de diagnóstico, sintomas clínicos, pesquisa de fator antinuclear (FAN) e pesquisa de anticorpos anti-DNA, além de exames de rotina como hemograma, glicemia, e as complicações relacionadas à doença. Os resultados foram apresentados por análise descritiva dos dados e em porcentagem. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões) – Campus de Santo Ângelo, e foi autorizado pelo responsável do serviço de reumatologia o médico Andrei Lottermann.

RESULTADOS

Foram analisados 17 prontuários médicos, de pacientes atendidos no serviço de reumatologia. Foi verificado que 16 (94,1%) são do sexo feminino e 1 (5,9%) é do sexo masculino (tabela 1). A idade média dos pacientes foi de 35,4 anos, apresentada na figura 1. O tempo de diagnóstico da doença de 62,9 ± 55,6 meses (figura 2).

Os sintomas clínicos avaliados são apresentados na tabela 2. A principal queixa dos pacientes foi a artralgia em 12 (70,6%), seguida por mialgia presente em 4 (23,5%) pacientes. A presença de eritema cutâneo foi observada em 8 (47,1%) pacientes, e rash malar em 6 (35,3%). Entre as complicações clínicas observadas, 11 (64,7%) dos pacientes apresentaram artrite, 6 (35,3%) apresentaram nefrite, 3 (17,8%) vaculite e 2 (11,8%) diabetes (figura 3).

Na análise dos padrões de imunofluorescência indireta e anticorpos anti DNA, foi observado que 1 (6,7%) paciente apresentou resultado não reagente, e uma maior frequência de padrões nuclear do tipo homogêneo e nuclear pontilhado fino. A presença de anticorpos anti-DNA foi de 3 (21,4%), apresentados na tabela 3.

Os títulos da imunofluorescência indireta foram descritos em 17 (100%) pacientes, apresentados na figura 4, os títulos estiveram presente na faixa de 160 à 5120, não apresentando títulos de 40 e 80.

TABELA I

Distribuição de idade e sexo dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

Variáveis	Pacientes com LES
Idade média(máx-mín)	35,4 (23-60)
Sexo	
Masculino N (%)	1 (5,9%)
Feminino N (%)	16 (94,0%)
Total N (%)	17 (100%)

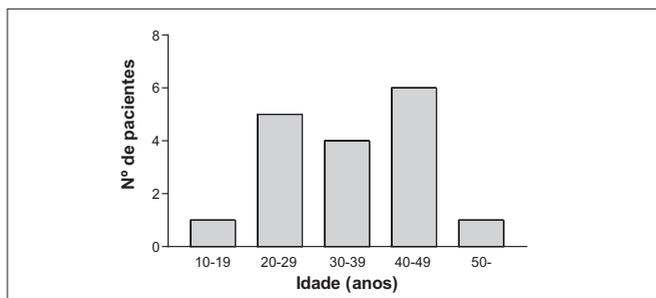


Figura 1 – Distribuição por faixa etária dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

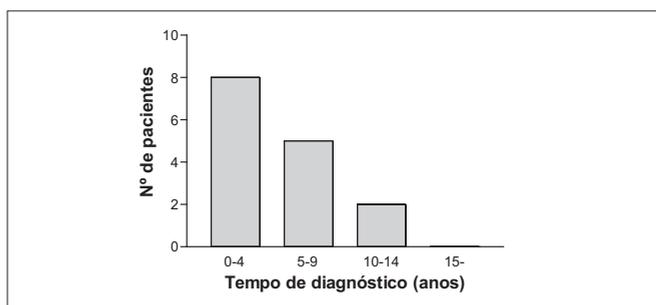


Figura 2 – Tempo de diagnóstico dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

TABELA II

Frequência dos sintomas nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

Sintomas	Pacientes com LES N(%)
Febre	2 (11,8%)
Alopecia	11 (64,7%)
Rash malar	6 (35,3%)
Lesões orais	6 (35,3%)
Eritema Cutâneo	8 (47,6%)
Fenômeno Raynaud	5 (29,4%)
Artralgia	12 (70,6%)
Mialgia	4 (23,5%)
TOTAL	17 (100%)

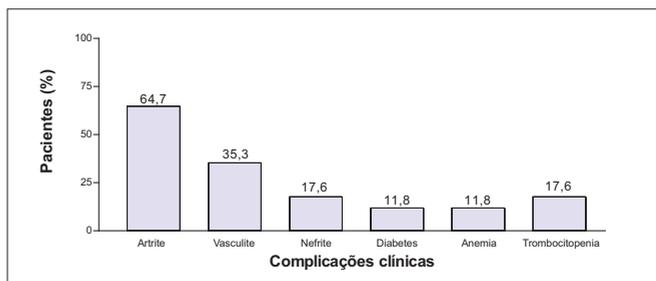


Figura 3 – Frequência (%) das complicações clínicas dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

TABELA III
Padrões de imunofluorescência indireta e presença de anticorpos anti-DNA nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

Padrões de imunofluorescência do FAN	Pacientes com LES N (%)
Nuclear homogêneo	3 (25%)
Nuclear pontilhado grosso	1 (8%)
Nuclear pontilhado fino	3 (25%)
Nuclear pontilhado fino denso	2 (16%)
Nuclear homogêneo e pontilhado fino	2 (16%)
Não reagente	1 (8%)
Total	12 (100%)
Teste anti-DNA	
Reagente	3 (21,4%)
Não reagente	11 (78,6%)
Total	14 (100%)

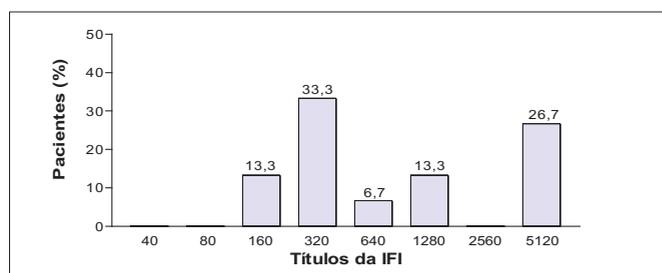


Figura 4 – Percentual de títulos da imunofluorescência indireta nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um serviço de reumatologia no município de Santo Ângelo/RS.

DISCUSSÃO

O LES apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, por ser uma doença multissistêmica, inflamatória do tecido conjuntivo, possui sintomas relacionados que não são específicos da doença (GORDON, 2001).

Com uma proporção entre os sexos feminino e masculino de 16:1 respectivamente, evidencia-se um predomínio do sexo feminino neste estudo, o que está de acordo com dados previamente estabelecidos, em estudo realizado por BEZERRA *et al.* (2005), observaram uma proporção de 20:1. Vários trabalhos relatam uma predominância do sexo feminino muito diferente, com grande variação, desde 4:1 (1), até 32:1 (ROCHA *et al.*, 2000). LIMA *et al.* (2005) destacam que o LES caracteriza-se como uma doença predominantemente feminina, acometendo mulheres em idade fértil. A média da faixa etária dos pacientes atendidos no serviço de reumatologia foi de 35,4 anos de idade, tendo variado de 16 a 60, o que está de acordo com análise realizada por LIMA *et al.* (2005), que encontraram uma média de 35 anos.

O tempo de diagnóstico dos pacientes atendidos no serviço de reumatologia no presente estudo, foi de 62,9 meses, ou seja, \pm 5 anos de doença ativa, que contribui para a grande variedade de sintomas e complicações clínicas relatados. Estes dados são semelhantes aos estudos realizados por ROCHA *et al.* (2000), que encontraram uma média de 61,7 meses, e BEZERRA *et al.* (2005), encontraram um tempo de doença de 65,6 meses.

Encontrou-se uma alta positividade de manifestações articulares, com artralguas presente em 70,6% dos pacientes e 64,7% com artrite. CHAHADE *et al.* (1995), demonstraram que 92% dos pacientes relataram artralgia, e que 82% dos pacientes com LES sofrem de artrite. As queixas articulares em pacientes com LES estão entre os sintomas mais fre-

quentes (CAZNOCH *et al.*, 2006). ROCHA *et al.* (2000), encontraram 97% dos pacientes lúpicos com artralgia. No LES todas as articulações, sejam grandes ou pequenas, podem estar afetadas, no início ou no decorrer da doença, o que ajuda a compreender a dificuldade do diagnóstico diferencial entre LES e artrite reumatóide na fase inicial da doença (CAZNOCH *et al.*, 2006).

No presente estudo, o comprometimento cutâneo foi frequente, com a presença de eritemas cutâneos em 47,6% e rash malar em 35,3% dos pacientes, embora esteja abaixo dos dados descritos pela literatura. BEZERRA *et al.* (2005), encontraram 90,2% dos pacientes com manifestações cutâneas e, rash malar em 60,4% dos casos, esta alta incidência deve-se ao fato da inclusão de outras manifestações cutâneas, como também ter sido realizado na cidade de Natal RN, a qual é considerada a cidade do sol, o que contribui pela alta incidência de raios UV e aumento da fotossensibilidade.

Neste estudo o fenômeno de Raynaud e alopecia foram encontradas em 29,4% e 64,7% respectivamente, o que está abaixo se comparada a 49% dos doentes com a presença do fenômeno de Raynaud dos estudos de CHAHADE *et al.* (1995) e ROCHA *et al.* (2000), porém ZIMMERMANN *et al.* (1997) relataram 14% dos pacientes com fenômeno de Raynaud. A alopecia teve uma incidência de 86% (ROCHA *et al.*, 2000), e em outro estudo obteve 42% (ZIMMERMANN *et al.*, 1997). O que revela uma grande oscilação nas frequências do fenômeno de Raynaud e alopecia, que são justificadas pela diferença entre os critérios utilizados pelos diferentes autores na caracterização dessas alterações (ROCHA *et al.*, 2000).

As outras manifestações clínicas encontradas foram febre com 11,8%, lesões orais com 35,3% e mialgia com 23,5%. Estes dados conferem com LIMA *et al.* (2005) que relataram lesões de mucosa em 30,5% e febre em 29,3% dos pacientes. As úlceras orais também apareceram em 44% dos casos segundo ROCHA *et al.* (2000), já BEZERRA *et al.* (2005), apresentaram 21,3% de lesões orais em 156 pacientes.

Dentre as complicações clínicas do presente estudo, a artrite teve a maior incidência, com 64,7% dos pacientes o que vem a complementar o fato de artralgia ser a queixa mais comum dos pacientes lúpicos, seguida pela vasculite com 35,3%, e nefrite com 35,2%, alguns estudos relatam 35% de vasculite (ROCHA *et al.*, 2000), e 28% de nefrite (BEZERRA *et al.*, 2005). As alterações hematológicas que compreendem a anemia hemolítica e trombocitopenia são comuns em pacientes com LES, estando presente neste trabalho em 11,8% e 17,6% respectivamente. A anemia hemolítica e a trombocitopenia foram encontrados em 9,8% e 14% (BEZERRA *et al.*, 2005) e outro estudo em 4% e 7% (ROCHA *et al.*, 2000), respectivamente.

De acordo com os critérios da Associação Americana de Reumatologia, uma das complicações não infecciosas do LES é a diabetes (BALBI *et al.*, 2001). DUBOIS *et al.* (1987) mostraram que entre 207 pacientes lúpicos, 3,5% apresentaram diabetes. Este estudo apresentou incidência 11,8% de diabetes.

A detecção dos auto-anticorpos tem prestado uma grande contribuição pela sua utilização: como marcadores de diagnóstico, indicadores de prognóstico e na monitorização da atividade do LES. No entanto, estes auto-anticorpos só tem significado clínico quando estão associados a outras manifestações da doença, e apesar de um teste de FAN ser positivo, não necessariamente indica um estado patológico (LORA *et al.*, 2007). Neste estudo o padrão nuclear pontilhado esteve presente em 50% e o padrão nuclear homogêneo em 41% dentre os padrões de imunofluorescência. QUEIROZ *et al.* (2003) demonstraram em seu trabalho que estes são os principais padrões no diagnóstico do LES, e

que o tipo de padrão sugere o acometimento de determinados órgãos, por exemplo, o padrão nuclear homogêneo sugere uma predisposição a nefrite lúpica. Também foi observado que 1 paciente, apresentou resultado não reagente, ou seja, FAN negativo e classificado como LES positivo de acordo com os achados clínicos, é possível tal situação, apesar de a sensibilidade do FAN para LES ser de 95-100% (LORA *et al.*, 2007). QUEIROZ *et al.*, (2003), relataram fato semelhante, já que isto ocorre devido ao paciente estar em tratamento com corticosteróides ou imunossuppressores, o que pode reduzir ou negativar os títulos do teste, ou ainda, à presença de outros auto-anticorpos.

Os títulos dos auto-anticorpos observados estavam compreendidos entre 160 e 5120, com uma incidência maior nas diluições 320 (33,3%) e 5120 (26,7%), não apresentando títulos em 40 e 80. Os títulos altos são mais preditivos para a doença (GORDON, 2001), porém, QUEIROZ *et al.* (2003), encontraram um maior predomínio da diluição de 40 devido aos pacientes estarem em uso de imunossuppressores e corticosteróide.

Três (21,4%) pacientes apresentaram teste anti-DNA positivo. Os pacientes portadores de LES têm principalmente anticorpos contra diversos antígenos nucleares. Níveis de anticorpos anti-DNA significantes confirmam o diagnóstico clínico de LES e são detectáveis em altas concentrações durante a doença ativa, entretanto, níveis baixos podem ser detectados nas seguintes condições: artrite reumatóide, doença de Hashimoto, doença de Graves, esclerose sistêmica, doença hepática auto-imune e síndrome de Sjögren (OLIVEIRA, 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados estão de acordo com a literatura que enfatiza que o LES é uma doença que ocorre predominantemente em mulheres em idade fértil, com achados clínicos clássicos os quais demonstrados neste estudo, como a presença de eritema cutâneo e um alto índice de comprometimento das articulações. A imunofluorescência indireta possui um papel fundamental, pois além de auxiliar no diagnóstico, é útil no prognóstico e no reconhecimento da doença ativa, o que implica em decisões terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Ao médico reumatologista Andrei Lottermann pela colaboração, entendimento, anuência e apoio destinado ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. BALBI, A.L.; BARBOSA, R.A.; LIMA, M.C.P.; ALMEIDA, D.B. Estudo comparativo das complicações terapêuticas no lúpus eritematoso sistêmico e nas glomerulopatias idiopáticas. *Revista Associação Médica Brasileira*. v. 47, nº 4, p. 296-301, Fev., 2001.
2. BEZERRA, E.L.M.; PEREIRA, M.J.; BARBOSA, O.F.C.; SANTOS, S.Q.; CASTRO, M.A.; TRINDADE, M.C., SATO, E.I. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Perfil clínico-laboratorial dos pacientes do hospital universitário Onofre Lopes (UFRN-Natal/Brasil) e índice de dano nos pacientes com diagnóstico recente. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 45, nº 6, p. 339-342, Nov/Dez., 2005.
3. CAMARGO, A.L.; OLIVEIRA, S.A. Lúpus Eritematoso Cutâneo - aspectos clínicos e laboratoriais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, nº 80, p. 119-129, Fev., 2005.
4. CAZNOCH, C.J.; ESMANHOTTO, E.; SILVA, M.B.; SKARE, T.L. Padrão de comprometimento articular em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e

sua associação com a presença de fator reumatóide e hiperelasticidade. *Revista Brasileira de Reumatologia*. V. 46, nº 4, p. 261-265, Jul/Ago., 2006.

5. CHAHADE, W.H.; SATO, E.I.; MOURA, J.J.E.; COSTALLAT, L.T.L.; ANDRADE, L.E.C. Occasional series: Lúpus around the world. Systemic Lupus Erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. *Revista Brasileira de Reumatologia*. v. 45, nº 6, 100-103, 1995.
6. COSTA, C.A.; PAPI, J.A.; COELHO, H.S.; NOGUEIRA, C.; VANDERBOGHT, B.; SOARES, J.A. Prevalência de hepatite C em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico do UCCF-UFRJ. *Revista Associação Médica Brasileira*, v. 1 nº 48, p. 42-47, Jan., 2002.
7. DUBOIS, E.L.; WALLACE, D.J. Management of discoid systemic lupus erythematosus. In: WALLACE, D.J.; DUBOIS, E.L. *Lupus erythematosus*. 3rd. Filadélfia: Lea & Febiger, p. 501-564, 1987.
8. GORDON, N.G. Doenças Metabólicas. In: GOLDMANN, L.; BENNET, J.C. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 21ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.
9. KLEJNBERG, T.; MORAES, H.V. Alterações oculares em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em acompanhamento ambulatorial. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v. 69, nº 2, p. 233-237, Fev., 2005.
10. KOSMINSKY S.; MENEZES R.C.; COELHO, M.R.D. Infecção pelo vírus Epstein-Barr em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 52, nº 5, p. 352-355, Mar., 2006.
11. LIMA, I.; NÉRI, F.; SANTIAGO, M.B. Dosagem sérica de adenosina desaminase em lúpus eritematoso sistêmico: Ausência de associação com atividade de doença. *Revista Brasileira de Reumatologia*. v. 45, nº 5, p. 273-279, Set/Out., 2005
12. LORA, O.S.; LAURINO, C.C.F.C.; FREITAS, A.E.; BRENOL, J.C.T.B.; MONTECIELLO, O.; XAVIER, R. Padrões de imunofluorescência do fator antinuclear (FAN) em células Hep-2 de soros reagentes para anti-SSA/Ro. *Revista Brasileira de Reumatologia*. v. 47, nº 1, p. 4-9, Jan/Fev., 2007.
13. OLIVEIRA, S.K.F. Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. *Reumatologia para pediatras*. Rio de Janeiro: Revinter, p. 132-152, 2003.
14. QUEIROZ, A.C.M.; FREIRE, A.L.; CHAVES, R.V.; ATANASIO, D.M.; MEDEIROS, S.D.V.; FONSECA, A.S.; SALES, V.S.F.; CRISPIN, J.C.O. Importância da detecção de anticorpos antinucleares pela técnica de imunofluorescência indireta Hep-2 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 35, nº 4, p. 187-189, 2003.
15. ROCHA, M.C.B.T.; TEIXEIRA, S.S.; BUENO, C.; VENDRAMINI, M.B.G.; MARTINELLI, R.P.; SANTIAGO, M.B. Perfil demográfico, clínico e laboratorial de 100 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico no estado da Bahia. *Revista Brasileira de Reumatologia*. v. 40, nº 5, p. 221-230, Set/Out., 2000.
16. ZIMMERMANN, A.F.; MESSIAS, I.J.; ITIYAMA, S.R.; CHYU, Y.Y.; NISIHRHA, R.M.; MOURA, M.L.; BARBOSA, J.M. Clinical, autoimmune and demographic profile in systemic lupus erythematosus (SLE) patients from southern Brazil. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. v. 7, nº 1, p. 24-31, Jan/Feb., 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Tiago Bittencourt de Oliveira
Rua Sepé Tiaraju, nº 189
CEP 98801-500 Santo Ângelo/RS.
E-mail: tiagofarm@gmail.com

Seleção de cepas de *Staphylococcus aureus*, β -lactamase positiva portadoras do gene *mecA**

Selection of *Staphylococcus aureus*, β -lactamase-positive strains with *mecA* gene

Daiani Cristina Savi, Ana Paula de Col¹ & Sideney Becker Onofre²

RESUMO - Um dos maiores problemas de Saúde Pública das últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos; a qual em estafilococos é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos β -lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), havendo a produção PBPs a, essa modificação é devido ao gene *mecA*, onde uma seqüência de DNA de origem não estafilocócica é incorporado ao cromossomo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência dos *Staphylococcus aureus* a β -lactâmicos em uruculturas, devido a presença do gene *mecA*. A metodologia consistiu, em semear a urina no meio BP. Após o crescimento realizou-se provas bioquímicas para identificação de *S. aureus* (Gram, catalase e coagulase); após a confirmação, realizou-se o antibiograma com oxacilina 1 μ g, considerando resistentes halos menores que 13 mm, para confirmar o gene *mecA*, inoculou-se as colônias resistentes em meio MH, com oxacilina à 6 μ g/mL. foi considerado positivo o crescimento microbiano. Com os resultados foi possível isolar 388 colônias, sendo 36 β -lactamases positiva, resistentes a oxacilina, ou seja, 9,27%, dessas 69,44% (26 colônias) foram identificadas como portadoras do gene *mecA*, a qual sugere a probabilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas.

PALAVRAS-CHAVE - *S. aureus*, β -lactâmicos e gene *mecA*

SUMMARY - One of the major Public Health problems of the last decades was the worsening of the resistance to antimicrobials, which in *Staphylococcus* is the result of chromosomal genes that codify modifications in the receptor of the β -lactamics, the penicillin-binding proteins (PBPs), resulting in the production of PBPs a. This modification is due to the *mecA* gene, where a sequence of non-*Staphylococcus* DNA is incorporated to its chromosome. The objective of the present study was to evaluate the resistance profile of *Staphylococcus aureus* to β -lactamics in urinary cultures due to the presence of the *mecA* gene. The methodology consisted in sowing urine in BP medium. After the growth, biochemical assays were carried out for the identification of *S. aureus* (Gram, catalase and coagulase); after the confirmation, antibiogram with oxacillin 1 μ g was made, where halos less than 13mm were considered resistant. To confirm the *mecA* gene, the resistant colonies in MH medium were inoculated with oxacillin 6 μ g/mL. Microbial growth was considered positive. With the results it was possible to isolate 388 colonies, being 36 β -lactamase positive resistant to oxacillin, that is, 9.27%; of these 69.44% (26 colonies) were identified as carrying the *mecA* gene, which suggests the probability of horizontal transfer of genes between distinct species.

KEYWORDS - Systemic Lupus Erythematosus (SLE), clinical manifestations, clinic complications, autoimmune.

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentado nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar. A qual está aumentando em todo o mundo, devido à facilidade de disseminação de patógenos resistentes TENOVER (24).

O primeiro relato de resistência a uma droga antimicrobiana data de 1907, e foi feito por Paul Ehrlich, registrou o aparecimento de tripanossomatídeos resistentes ao quimioterápico "rosanilina" tão logo este foi desenvolvido LOWY (15). No período pré-antibiótico os principais micro-organismos causadores de infecção hospitalar eram os cocos Gram positivos, e a mortalidade de pacientes com bacteremia por *Staphylococcus aureus*, era em torno de 80,0% dos infectados VILELA (26).

As bactérias são consideradas resistentes quando seu crescimento não é afetado pelo nível máximo de antibacteriano tolerado pelo hospedeiro. CHAMPE & HARVEY (5). Um fator importante no desenvolvimento de cepas de micro-organismos resistentes a drogas é que muitos antibióticos são bacteriostáticos em vez de bactericidas; e os micróbios com

maior capacidade de recuperação escapam das defesas e desenvolvem resistência aos antibióticos BLACK (2).

Um dos micro-organismos com maior índice de resistência é o *Staphylococcus aureus*, e também um dos mais antigos, o isolamento de estafilococos resistentes às penicilinas pôde ser observado logo após os primeiros experimentos com a introdução da penicilina G na clínica em 1941, registrando-se em 1944 e 1945 índices de resistência de 12 a 22% TAVARES (23). As primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA) foram descritas na década de 60, porém este micro-organismo tornou-se importante causa de infecção hospitalar no início da década de 70, quando começaram a ser descritos os primeiros surtos MOREIRA (19). Há basicamente dois mecanismos responsáveis pela resistência de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos que possuem anel β -lactâmico. Um mecanismo é a produção de β -lactamases, que são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à penicilina e que levaram ao desenvolvimento de penicilinas antiestafilocócicas, resistentes às β -lactamases, como a meticilina; outro mecanismo é uma alteração nas proteína fixadoras de penicilinas (PBPs) UENO (25).

Nos estafilococos, chamados MRSA ou ORSA (siglas em inglês indicando *Staphylococcus aureus* meticilina ou oxa-

Recebido em 07/12/07
Aprovado em 03/01/09

*Laboratório de Microbiologia da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão – PR. Apoio financeiro da Universidade Paranaense – UNIPAR.
1.Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão – PR – E-mail: daiani-savi@bol.com.br
2.Biólogo, Professor Titular da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão – PR – E-mail: sideney@unipar.br

cilina resistentes) a resistência é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos beta-lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), havendo a produção de novas PBPs (PBP 2' ou PBP 2a) com pequena afinidade pelos beta-lactâmicos. Essa modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), é sintetizada pelo gene *mecA*, onde uma seqüência de 2130 pb do DNA de origem não estafilocócica é incorporado ao seu cromossomo, sendo um dos principais mecanismos de resistência descritos COELHO (6).

As PLP são enzimas responsáveis pela estabilidade e integridade da parede celular durante o crescimento bacteriano e processo de divisão, atuando na síntese dos peptidoglicanos. A ligação das penicilinas às PLP impede a ação dessas enzimas, provocando a lise bacteriana, mas com a ação do gene *mecA* a PLP consegue manter sua função mesmo em contato com a meticilina ou oxacilina MONTE (18)

O gene *mecA* e seu produto gênico não são exclusivos no controle do fenótipo de resistência, uma vez que as cepas isoladas, independente de sua concentração inibitória mínima, contêm quantidades comparáveis de PBP 2a, sugerindo que outros fatores, alheios ao produto gênico do *mecA*, exercem um papel essencial na expressão fenotípica da resistência UENO (25).

Além de tudo, estudos vêm demonstrando que o ORSA apresenta letalidade maior que os *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina MOREIRA (19).

Neste contexto é que este trabalho isolou cepas de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas portadoras do gene *mecA* de uroculturas de pacientes com infecção do trato urinário.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras avaliadas foram fornecidas pelo Laboratório de análises clínicas Biocenter, localizado na cidade de Pato Branco, Estado do Paraná. A coleta foi realizada seguindo os procedimentos padrões de forma que a amostra seja representativa e com o menor índice de flora normal possível CATTEL (3).

As amostras foram semeadas pelo método de contagem de colônias no meio de cultura Baird-Parker (BP), e incubadas a 37°C durante 24 horas. As colônias com características de *S. aureus* foram submetidas a provas bioquímicas de identificação, Gram, catalase e coagulase.

O método utilizado para o teste de resistência a Meticilina / Oxacilina foi o método de difusão em disco simples. Três a cinco colônias com morfologia similar foram selecionadas e foram suspensas em solução de NaCl 0,85%, obtendo-se turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC).

A partir desta suspensão, foi realizado semeadura em meio Agar Mueller-Hinton (Merck) MAZA (19). Depois disso, discos de papel contendo oxacilina 1 µg, foram depositados sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35° C por 24 horas. A leitura da sensibilidade à oxacilina foi feita medindo-se a zona de inibição de crescimento em mm NCCLS (20).

A oxacilina foi usada por ser mais resistente à degradação durante a armazenagem e também por possibilitar a detecção de hetero-resistência CHAMBERS (4).

Os resultados foram interpretados segundo as Normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (20), que considera *Staphylococcus aureus* coagulase-positivo sensível à oxacilina quando o diâmetro do halo for de 13mm e resistente quando < 12mm.

Cada colônia resistente, foi avaliada em relação a presença e ausência de β-lactamases pelo método iodométrico, o qual consiste em fitas contendo iodo, as quais na presença de beta-lactamase, ficam com coloração clara.

Para detectar e confirmar a presença do gene *mecA*, foi utilizado o ágar Mueller Hinton com discos modificados de oxacilina 61g. Para isso preparou-se o inóculo na escala 0,5 Mc Farland, o qual foi incubado durante 24 horas a 35° C. A ausência de halo de inibição indicou a presença do gene *mecA* NCCLS (20). Todas as atividades foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a análise do perfil de resistência das cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de urina, coletadas no Laboratório de Análises Clínicas Biocenter da cidade de Pato Branco, Estado do Paraná, no período de fevereiro a junho do ano de 2007, estão sumarizados na Tabela 1.

TABELA I
Perfil de resistência a oxacilina em colônias de *S. aureus* portadoras do gene *mecA*.

Nº de colônias	Colônias R.	gene <i>mecA</i>
388	36	26

R. Colônias resistentes a Oxacilina.

Os resultados demonstraram que 36 colônias isoladas e identificadas, isto é, 9,27% foram a resistência oxacilina, corroborando com resultados de trabalhos desenvolvidos por SHUHAIBAR & FALKINER; TAHNKIWALE *et al* e KASZANYITZKY (21,22,14).

Do total de 36 colônias resistentes a oxacilina, 26 (72,22%), foram positivas para o gene *mecA*. Em trabalhos desenvolvidos por DUIJKEREN *et al*, GORTEL *et al* e GRISOLD *et al* (7,11,12), foram encontrados os seguintes percentuais para presença do gene *mecA* em estafilococos resistentes à oxacilina (57,6%; 54,0% e 99,0%, respectivamente). A presença do gene *mecA* em *S. aureus* proveniente de amostras humanas sugere a probabilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas. WIELDERS *et al* (27) apresentaram dados moleculares que suportam a teoria de que a transferência do gene *mecA* entre linhagens de *Staphylococcus* spp ocorre, permitindo o aparecimento de clones de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) disseminados pelo mundo, e de que essa disseminação pode ser favorecida pela pressão seletiva oriunda do uso indiscriminado de antimicrobianos. ANTHONISEN (1) avaliou, através das técnicas de PCR e de hibridação, seqüências de DNA de extraídos de *S. haemolyticus* isolados de diferentes espécies animais e de amostras humanas e concluíram que as seqüências apresentaram 100% de similaridade, sugerindo que a transferência horizontal pode ocorrer entre esses clones, além de ocorrer entre cepas que colonizam hospedeiros humanos e animais.

Um total de 10 colônias (27,78%) dos isolados foram resistentes em pelo menos um teste de suscetibilidade à oxacilina, (difusão em disco e fita de β-lactamase) sendo, porém, negativos para o gene *mecA*. Estas cepas podem ter desenvolvido resistência através de um outro mecanismo, como o da hiperprodução de β-lactamase GEHA *et al* (8). Esses resultados contribuem com resultados obtidos por GENTLEMAN & GENTLEMAN; KAMPF *et al* e GERBERDING *et al* (9, 13, 10). O uso incorreto, associado à seleção natural dos micro-organismos, provavelmente, resultou no fenômeno da resistência. Segundo MENG (17), a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobia-

nos para a prevenção de doenças e para a promoção do crescimento e da eficiência alimentar em animais de produção.

CONCLUSÕES

Os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras de urina, apresentaram resistência a oxacilina, ao nível de 9,27% das amostras, sendo considerando β -lactamase positivas. As cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina, quando avaliados, em concentrações de 6 μ g de oxacilina, que continuaram mostrando resistência a oxacilina, foram com isso consideradas portadoras do gene *mecA*. A presença do gene *mecA* em *S. aureus* proveniente de amostras humanas sugere a possibilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas.

REFERÊNCIAS

- 1 - ANTHONISEN, I.L.; SUNDE, M.; STEINUM, T.M.; SIDHU, M.S. & SORUM, H. - Organization of the Antiseptic Resistance Gene *qacA* and Tn552-Related -Lactamase Genes in Multidrug-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Strains of Animal and Human Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, (11): 3606-3612, 2002.
- 2 - BLACK, G. - *Microbiologia fundamentos e perspectivas*. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999, 323-325 p.
- 3 - CATTEL W.R. - *Infections of the kidney and urinary tract*. Oxford University Press, London, 375p, 1996.
- 4 - CHAMBERS, H.F. - Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Review*, 10: 781-791, 1997.
- 5 - CHAMPE, P.C. & HARVEY, R.C. - *Farmacologia Ilustrada*. 1 ed. Porto Alegre, Artmed, 1998, 233 p.
- 6 - COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SORAES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P. & SOUZA, M.M.S. - Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. *Cienc. Rural*, 37 (1): 195-200, 2007.
- 7 - DUIJKEREN, E.V.; BOX, A.T.A.; HECK, M.E.O.C.; WANNET, W.J.B. & FLUIT, A.C. - Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary Microbiology*, 103: 91-97, 2004.
- 8 - GEHA, J.D.; UHL, J.R.; GUSTAFERRO, C.A. & PERSING, D.H. - Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1768-1772, 1994.
- 9 - GENTLEMAN, R.; GENTLEMAN, R. - R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5: 299-314, 1996.
- 10 - GERBERDING, J.L.; MIICK, C.; LIU, H.H. & CHAMBERS, H.F. - Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 2574-2579, 1991.
- 11 - GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKONA, I.; WHITTEM, T.; & WEISIGER, R.M. - Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 60 (30): 1526, 1999.
- 12 - GRISOLD, A.J.; LEITNER, E.; MUHLBAUER, G.; MARTH, E. & KESSLER, H.H. - Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (7): 2392-2397, 2002.
- 13 - KAMPF, G.; LECKE, C.; CIMBAL, A.; KLAUS, W. & RUDEN, H. - Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (8): 2254-2257, 1998.
- 14 - KASZANYITZKY, E.J. - Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52 (1): 7-17, 2004.

- 15 - LOWY, F.D. - Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Investigation*, 111: 1265-1273, 2003.
- 16 - MAZZA, L. M. - *Atlas de Diagnóstico em Microbiologia*. 1 ed. Porto Alegre, Artmed, 1999, 32 p.
- 17 - MENG, J. - Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *Journal of Food Protection*, 61 (11): 1511-1514, 1998.
- 18 - MONTE, VELLOSO FREITAS, L. - Detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina por meio de multiplex pcr em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística. 2005. 113 p. Tese de Docência livre - Instituto de Microbiologia da USP. São Paulo.
- 19 - MOREIRA, M. - The effect of bloodstream hospital infection by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin on the mortality and the length of hospitalization. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 44 (4): 263-268, 1998.
- 20 - NCCLS - National Committee For Clinical Laboratory Standards - for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standart - M2A7. 7ed. 2000.
- 21 - SHUHAIBAR, M.N. & FALKINER, F.R. - The prevalence, antibiotic susceptibility and phage-type of nasally carried *Staphylococcus aureus* in the Dublin community. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 161 (10): 589, 1992.
- 22 - TAHNKIWALE, S.S.; ROY, S. & JALGAONKAR, S.V. - Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. *Archives of International Medicine*, 56 (7): 330, 2002.
- 23 - TAVARES, W. - Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33 (3): 281-301, 2000.
- 24 - TENOVER, F. C. - Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infections Diseases*, 33 (5): 108-115, 2001.
- 25 - UENO, M. - Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. *Biocienc*, 7 (2): 15-22, 2001.
- 26 - VILELA ANSELMO, M. - Padrão de resistência antimicrobiana de casos de infecções nosocomiais no Recife, Pernambuco, Brasil 2002-2003. 2004. 91 p. Tese de Docência livre - Instituto de saúde coletiva da FIOCRUZ. Recife.
- 27 - WIELDERS, A.L.C.; FUIT, S.B.; VERHOEF, J. & SHUMITZ - *MecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (11): 3970-3975, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Sideney Becker Onofre
Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus de Francisco Beltrão
Av. Julio Assis Cavalheiro, 2000
Bairro: Industrial
CEP 85601-060 - Francisco Beltrão/PR.
E-mail: sideney@unipar.br

Educação continuada à distância é com a **SBAC**

Navegue pelo portal **SBAC E-Learning**

www.sbac.org.br/ead



 **SBAC**
*e*LEARNING

A mais perfeita tradução de proximidade!