

R B A C

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Uso de pinças ópticas para avaliação do potencial zeta de hemácias em edta, cpd-sagm e estocadas.....	237
<i>D. C. N. Silva, H. P. Fernandes, C. N. Jovino, M. M. Filho, A. F. M. Filho, A. D. P. R. Oliveira, P. M. A. Farias, B. S. Santos, C. L. Cesar, M. L. Barjas-Castro, A. Fontes</i>	
Use of optical tweezers for evaluation of zeta potential of red blood cells in edta, cpd-sagm and stored in blood banks	
Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a <i>Mycoplasma arginini</i>, <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i>.....	241
<i>Samuel Mendes de Cordova, Camila Simões Benfatti, Michele Deblasi Alberton Magina, Alessandro Guedes, Caio Maurício Mendes de Cordova</i>	
Evaluation of the antibacterial activity of extracts isolated from native plants of the Brazilian flora against <i>Mycoplasma arginini</i> , <i>M. hominis</i> and <i>Ureaplasma urealyticum</i>	
Frequência de grupos sanguíneos dos sistemas ABO e Rh na população de Belo Horizonte-MG.....	245
<i>Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Rejane Silva Diniz, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Karina Braga Gomes</i>	
Frequency of ABO and Rh blood groups in the population of Belo Horizonte-MG	
Influência de tinturas de fruto cereja e verde de café no tratamento do Diabetes.....	249
<i>Luciana Marques Cardoso, Tânia Toledo de Oliveira, Aloisio da Silva Pinto, Maria Aparecida Leão, Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, Marcelo Rocha da Costa, Marilane Kalyetta Almeida Fonseca, Ricardo Antônio Zatti, Tanus Jorge Nagem</i>	
Influences of teinturerie of fruits cherry and green the coffee trait the Diabetes	
Perfil sorológico dos marcadores de Hepatite B em profissionais acadêmicos da área da saúde.....	255
<i>Mirna Giselle Moreira, Patrícia de Fátima Evangelista, Leticia Antunes Athayde</i>	
Serologic profile of Hepatitis B markers in professionals academics of the area of the health	
Anticorpos anti-toxoplasma em gestantes atendidas em unidades de saúde do município de Ijuí/RS.....	261
<i>Maílei Üecker Pletsch, Karla Renata de Oliveira, Francine Toller Saraiva</i>	
Anti-toxoplasma antibodies in pregnancies attending in health unit at Ijuí city/RS	
Herpês Simplex 2 e Citomegalovírus Efeitos Citopáticos vs. Mecanismos de Infecção.....	265
<i>Batista, A.; Caeiro, A.; Mendonça, P.; Amaral, I.</i>	
Herpes Simplex 2 Virus and Cytomegalovirus Cytopathic Effects vs. Infection Mechanisms	
Determinação do marcador Anti-HBc na prevenção da transmissão transfusional do vírus da Hepatite B: importância e implicações.....	269
<i>Aline B. Wohlfahrt, Sandra T. Beck, Aline Foletto, Adrienne Ceccim</i>	
Anti-HBc determination to prevent the post-transfusional Hepatitis B infection: importance and implications	
Variabilidade biológica na concentração de lipídeos séricos em idosos.....	273
<i>Daniele da Costa, Darlene Camati Persuhn</i>	
Biological variability in concentration of serum lipids in elderly	
Prevalência de anemia nas gestantes atendidas no Sistema Único de Saúde – Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de Belo Horizonte.....	277
<i>Margarita Elizabeth Lafuente TAPIA, Maria Lúcia Silva FALCÃO, Maria de Lourdes Baêta Zille GONTIJO, Catharine Souza MARTINS, Karina Augusta VIANA, Luci Maria Sant'Ana DUSSE, Maria das Graças CARVALHO</i>	
Prevalence of anemia in pregnant women assisted by the Sistema Único de Saúde - Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura de Belo Horizonte	
Biossegurança em laboratório clínico. Uma avaliação do conhecimento dos profissionais a respeito das normas de precauções universais.....	283
<i>Márcia Andréa Marques, Marco Antonio Costa, Monica Tereza Suldotski, Gislaine Franco de Moura Costa</i>	
Bio-safeties in clinical laboratory: avaluation of professional's knowleg about universal caution rules	
Soroprevalência de Toxoplasmose em pacientes de Hemodiálise atendidos em Erechim/RS.....	287
<i>Aline Gilloli; Sandra Manoela Dias Macedo; Márcia Maria Falkoski Vieira; Jean Carlos Zanardo; Marisa Lúcia Romani Paraboni</i>	
Soroprevalence of toxoplasmosis in patients of hemodialysis taken care in Erechim/RS	
Estudo comparativo da eficiência da eletroforese alcalina em acetato de celulose na identificação de hemoglobinas utilizando diferentes tampões.....	293
<i>Flávio Silva de Carvalho, Karla Greick Batista Dias-Penna, Érica Silva de Araujo, Andréa Luciana Martins Ramos, Luiz Artur Mendes Bataus</i>	
Comparative study of the alkaline electrophoresis on cellulose acetate efficiency to identify hemoglobins by using different buffers	
Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica do polvilho de lobeira (<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill)* <i>in vivo</i>.....	297
<i>Thiago Belchior de Oliveira, Kátia Aparecida Aguiar Salazar, Stella Maris da Silveira Duarte, Denise Aparecida Corrêa Moreira e Fernanda Borges Araujo de Paula</i>	
Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of polvilho de lobeira (<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill) <i>in vivo</i>	
Identificação laboratorial de β-lactamases de espectro estendido (esbls) em espécimes clínicos de origem hospitalar.....	303
<i>Andréa Silva de Souza; Jane Bonissato Torres; Rodrigo Coelho de Oliveira</i>	
Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) of human clinical samples origin hospital	
Infecções do Trato Urinário Diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS.....	307
<i>Viviane Tortelli Menin, Nelva Aparecida Grazziotin</i>	
Urinary Tract Infections Diagnosed at the Laboratory of the University URI - Campus of Erechim/RS	

4

VOLUME 42

2010

Uso de pinças ópticas para avaliação do potencial zeta de hemácias em EDTA, CPD-SAGM e estocadas

Use of optical tweezers for evaluation of zeta potential of red blood cells in EDTA, CPD-SAGM and stored in blood banks

D. C. N. Silva¹, H. P. Fernandes², C. N. Jovino³, M. M. Filho¹, A. F. M. Filho¹, A. D. P. R. Oliveira¹, P. M. A. Farias¹, B. S. Santos³, C. L. Cesar⁴, M. L. Barjas-Castro² & A. Fontes¹

RESUMO - A hemácia é carregada negativamente, principalmente devido ao ácido siálico, o que gera um potencial elétrico denominado Potencial Zeta (ζ), que impede a aglutinação intravascular. Os testes de hemaglutinação na rotina transfusional, necessitam de substâncias potencializadoras, das quais muitas agem diminuindo o ζ para se ter maior sensibilidade. Através da Pinça Óptica, ferramenta capaz de capturar células utilizando a luz, foi proposta uma metodologia para quantificar o ζ e aplicar em hemácias coletadas com EDTA e estocadas em CPD-SAGM (visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas a lesões de armazenamento). Os ζ em CPD-SAGM foram superiores (-14,8 mV) aos em EDTA (-7,9 mV) e decrescentes a partir do primeiro dia de armazenamento, estabilizando-se a partir da terceira semana com $\zeta = -7,6$ mV. Hemácias com CPD-SAGM apresentaram ζ maior, pois possivelmente este conservante evitou lesões mais significativas da membrana que poderiam alterar as cargas. A redução do ζ no armazenamento pode ser consequência de enzimas liberadas de leucócitos lisados que tenham alterado as glicoforinas da membrana. A metodologia permitiu avaliar o ζ em diferentes condições e poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação com diferentes meios potencializadores e no melhor conhecimento das lesões de estocagem para fins transfusionais.

PALAVRAS-CHAVE - Potencial Zeta, Imunohematologia, EDTA, CPD-SAGM, Estocagem.

SUMMARY - Erythrocytes are negatively charged, mainly due to sialic acids, which generate an electrical potential called Zeta Potential (ζ), preventing intravascular agglutination. Hemagglutination tests applied in transfusional routine use reactions potentiators. Many of them act by decreasing the ζ to obtain a higher reaction sensitivity. Using Optical Tweezers, a tool that captures cells using light, we proposed a methodology to quantify the ζ . We measured the ζ of red blood cells (RBCs) collected with EDTA and stored in CPD-SAGM to evaluate changes in the membrane charges related to storage injuries. The ζ for CPD-SAGM was higher (-14.8 mV) than for EDTA (-7.9 mV) and decreased from the first day of storage, remaining stable from the third week with $\zeta = -7.6$ mV. The RBCs ζ with CPD-SAGM presented higher values, possibly because of the preservative medium, which prevents significative lesions of the cell membrane that could modify the charges. The reduction for stored cells can be caused by enzymes released from lysed leukocytes that can change membrane glycoporphins. The methodology here proposed allowed the evaluation of ζ under different conditions, which can contribute to the standardization of hemagglutination techniques with different reactions potentiators and a better knowledge of the lesions of RBCs stored for transfusion.

KEYWORDS - Zeta Potential, Immunohematology, EDTA, CPD-SAGM, Storage.

INTRODUÇÃO

A incorporação de lasers na microscopia óptica tem colaborado consideravelmente para as mais modernas pesquisas nas áreas biomédicas com propósitos de manipulação, medidas, diagnósticos e microanálises. Entre as modernas técnicas, destaca-se a pinça óptica, uma ferramenta de alta sensibilidade que utiliza um laser no infravermelho fortemente focalizado por uma objetiva de um microscópio que possibilita o aprisionamento e a movimentação de partículas da ordem de micrômetros [2]. As forças, da ordem de femto a picoNewtons, exercidas pela pinça óptica sobre as partículas, permitem especialmente a captura e a medida de propriedades de células e pequenas organelas, que podem ser manipuladas individualmente sem qualquer dano térmico. Entre as várias aplicações da pinça óptica, temos: a manipulação de material genético em diferentes tipos celulares [16], a mensuração do comprimento de moléculas de DNA [19], a detecção de concentrações femtomolares e atômicas de antígenos [14], modificação estrutural de estruturas microtubulares [8], a medição de deslocamentos celulares e mecanismos de adesão leucocitária [21], e a análise da motilidade de espermatozoides [15] e tripanossomatídeos [18]. Para o estudo da biologia eritrocitária, a pinça óptica per-

mite a manipulação e a medida de propriedades mecânicas (adesão, viscosidade da membrana e elasticidade) de hemácias normais e alteradas por algum fator externo, por exemplo: estocagem, irradiação, ação de um medicamento ou até mesmo por uma doença hematológica [3, 4, 13]. Além disso, a pinça óptica também permite a mensuração das cargas elétricas da membrana eritrocitária [10]. A superfície eritrocitária possui algumas glicoproteínas conjugadas ao ácido siálico, principal responsável pela carga negativa da membrana da hemácia, que em solução criam um potencial elétrico repulsivo denominado Potencial Zeta (ζ) [9, 17]. É esse potencial repulsivo que impede a agregação dos eritrócitos na corrente sanguínea. Essa carga elétrica negativa influencia a distribuição dos íons da solução ao redor da célula formando duas camadas, a primeira compacta com íons rigidamente ligados à hemácia e uma segunda camada de íons distribuídos difusamente. Quanto maior a camada iônica em torno da célula, maior em módulo será o valor do ζ , dificultando a agregação intercelular. Todavia, há procedimentos laboratoriais, que visam diminuir o ζ e permitir a aglutinação celular, como as reações de hemaglutinação, amplamente utilizadas em imunohematologia [1]. Essas reações são baseadas na ligação de anticorpos com antígenos da membrana eritrocitária, onde a formação e detecção de agregados celu-

Recebido em 20/04/2010

Aprovado em 31/07/2010

Este trabalho foi agraciado com o Prêmio SBAC de 2010

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco

²Hematology and Transfusion Center, Universidade Estadual de Campinas

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

⁴Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas

lares correspondem a resultados positivos. Uma maior sensibilidade destes testes ocorre com a diminuição do ζ , por favorecer a aproximação das hemácias e conseqüentemente a formação de pontes entre antígenos e anticorpos que é visualizada macroscopicamente como agregados. Esse princípio é explorado por substâncias denominadas potencializadoras, normalmente utilizadas para aumentar a sensibilidade das reações de hemaglutinação [11].

Neste trabalho, foi proposta uma metodologia utilizando a técnica de pinças ópticas para a quantificação do ζ e a sua aplicação para medidas de hemácias coletadas em EDTA (K_3 - anticoagulante normalmente utilizado para pesquisa de antígenos eritrocitários pelas reações de hemaglutinação) e para células de concentrado de hemácias preservadas em CPD-SAGM e estocadas por períodos crescentes, visando avaliar alterações de cargas da membrana relacionadas a diferentes condições de coleta e às lesões de armazenamento. Nós acreditamos que uma melhor compreensão das cargas de membrana da hemácia pode levar a um aprimoramento da sensibilidade e especificidade das reações de hemaglutinação e guiar o desenvolvimento de novas substâncias potencializadoras para serem usadas em Hemocentros.

MATERIAL E MÉTODOS

PINÇA ÓPTICA: O sistema de pinças ópticas utilizado consiste de um feixe de laser no infravermelho próximo ($\lambda=1064$ nm – IPG Photonics, EUA), passando por um conjunto de lentes e focalizado no material de análise através de uma objetiva de 100x. Esta é acoplada a um microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha) equipado com platina motorizada (Prior Scientific, Inglaterra) e sistema de captura de imagem em tempo real constituído de uma câmera de vídeo (SDC-415ND, Samsung, Japão) e uma placa de vídeo (Pinnacle Systems, EUA) acoplada a um computador. A Figura 1 ilustra o sistema de pinças ópticas.

CÂMARA PARA MEDIDA DO POTENCIAL ZETA: Para a mensuração do ζ desenvolveu-se uma câmara que permite a realização das medidas nas mesmas condições eletrolíticas das reações de aglutinação utilizadas na prática imunohematológica. Esta câmara feita em acrílico apresenta dois reservatórios laterais que se comunicam através de um canal de 25 mm de comprimento (L), 2 mm de largura (W) e 75 μ m de profundidade (δ). Nos reservatórios foram instalados eletrodos de platina (99,95%, Heraeus, São Paulo), material não reativo em processos eletrolíticos, a uma distância média de 40 mm entre si. Para geração de um campo elétrico foi utilizada uma fonte de alta voltagem ligada aos eletrodos. A Figura 2 mostra um esquema da câmara de medidas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS: Trinta e uma células em CPD-SAGM (Citrato, Fosfato, Dextrose, Solução Salina, Adenina, Glicose e Manitol) obtidas do tubo conector da bolsa do concentrado de hemácias e quarenta e nove de tubos de coleta a vácuo com EDTA (K_3), foram analisadas no primeiro dia de estocagem. Realizou-se medidas temporais a cada 5 dias até o 25° dia de armazenamento dos eritrócitos das bolsas do concentrado de hemácias com solução de CPD-SAGM, sendo analisadas 10 células a cada experimento. Todas as amostras foram obtidas de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), pertencentes ao grupo O Rh (D) positivo. As amostras foram diluídas em soro do grupo AB Rh (D) positivo (0.5:500 μ L). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa desta instituição (Parecer N°. 003/2009).

MEDIDAS DO ZETA: Após a diluição, a solução com as hemácias é adicionada na câmara em volume suficiente para preencher o canal que comunica os dois reservatórios que contém os eletrodos. Utilizando as pinças ópticas captura-se uma hemácia e para a mesma célula aplicam-se diferentes voltagens (30, 40, 50, 60, 70 e 80 V) no sistema. Como a hemácia é carregada e a solução ao seu redor é eletrolítica, ela irá se mover em velocidade constante de acordo com a voltagem aplicada, como ilustrado na Figura 3. Assim, para cada voltagem mede-se a velocidade terminal da hemácia e se recaptura a mesma célula para ser aplicada a próxima voltagem. Métodos baseados em medidas individuais são mais sensíveis a pequenas diferenças existentes que métodos baseados somente em médias. Todas as medidas foram gravadas em tempo real e as imagens foram analisadas qualitativamente com auxílio dos softwares Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e VirtualDub (by Avery Lee). Após as medidas e as análises, o ζ foi determinado experimentalmente através da equação de Smoluchowski [20]:

$$v = (\epsilon \zeta / \eta) E,$$

onde V é a velocidade terminal medida, E é o campo elétrico dado pela voltagem dividida pela distância entre os eletrodos, ϵ é a constante dielétrica do soro sanguíneo [7] e η é a viscosidade do soro sanguíneo medida, utilizando um viscosímetro de Ostwald. Assim, através de uma curva de velocidade em função do campo elétrico podemos determinar o ζ .

RESULTADOS

Para a análise dos eritrócitos do 1° dia, obtidos de bolsas de concentrado de hemácia com solução de CPD-SAGM e em tubos em EDTA (K_3), observamos uma diminuição do ζ na presença do EDTA, ilustrado nos histogramas da Figura 4. Os valores médios, máximos e mínimos obtidos para o ζ com EDTA e CPD-SAGM estão na Tabela 1. A média do ζ das hemácias em CPD-SAGM foi $\zeta = -14,5$ mV e em tubos com EDTA foi $\zeta = -7,9$ mV. As células estocadas apresentaram valores decrescentes do ζ durante as duas primeiras semanas, estabilizando-se a partir da terceira semana, assim como mostra a Figura 5. As hemácias estocadas apresentaram os seguintes valores: 5° dia: $\zeta = -13,5$ mV, 10° dia: $\zeta = -9,0$ mV, 15° dia: $\zeta = -7,5$ mV, 20° dia: $\zeta = -7,5$ mV e 25° dia: $\zeta = -7,8$ mV.

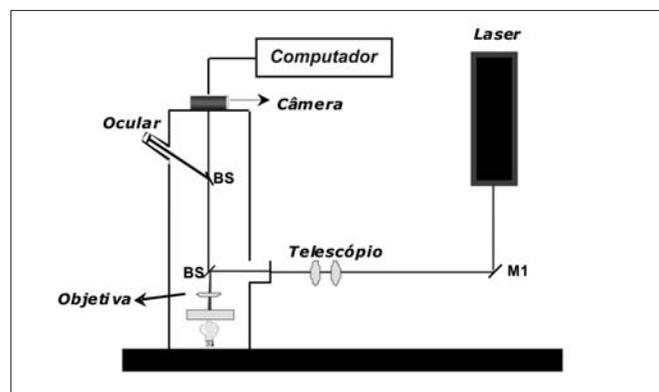


Figura 1: Esquema de montagem da pinça óptica.

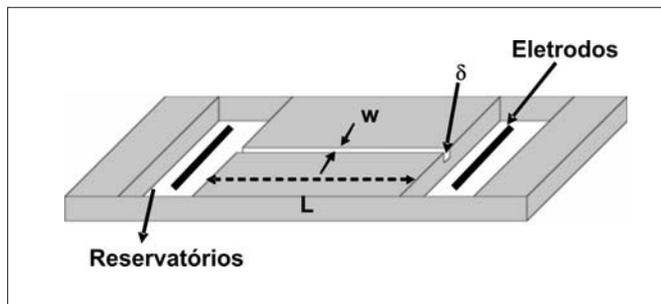


Figura 2: Esquema da câmara de medidas.

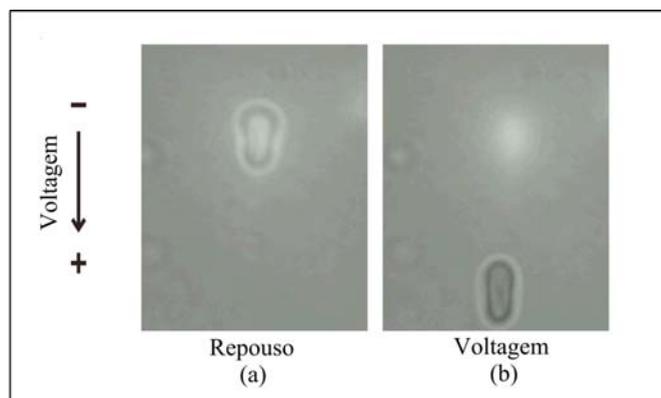


Figura 3: Migração de hemácia submetida a voltagens.

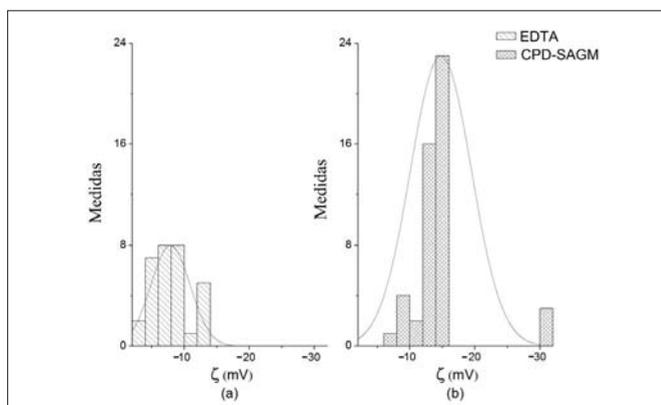


Figura 4: Histogramas da distribuição do potencial Zeta: (a) EDTA e (b) CPD-SAGM.

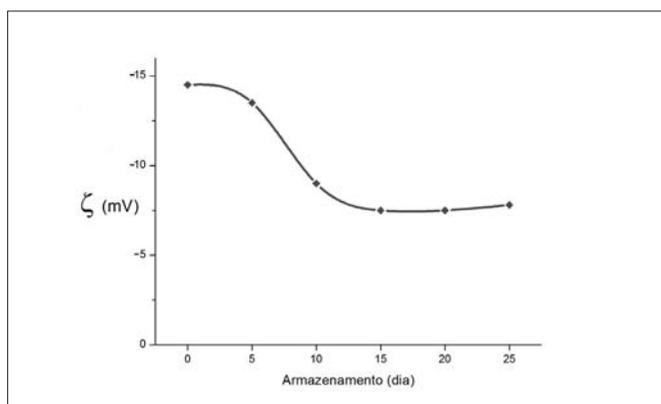


Figura 5: Evolução temporal do ζ durante o armazenamento em CPD-SAGM.

TABELA I
Valores do ζ obtidos em EDTA e CPD-SAGM.

	N total	Média (ζ) mV	Mínimo (ζ) mV	Máximo (ζ) mV
EDTA	31	- 7.9	- 3.1	- 14.0
CPD/SAGM	49	-14.8	- 7.8	- 31.1

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Devido a sua propriedade não conservante, o EDTA (K_3) não previne danos oxidativos, podendo assim favorecer a redução das cargas elétricas, com conseguinte diminuição do ζ . O próprio EDTA tem sido citado por sua possível ação sobre as propriedades da membrana eritrocitária alterando, por exemplo, a permeabilidade e elasticidade celular através de danos a proteínas membranares [12], logo tal processo também pode ser sugerido como o possível mecanismo responsável pela diminuição das cargas. Já para as hemácias estocadas, provavelmente, a degeneração de leucócitos presentes no concentrado tenha possibilitado a diminuição das cargas negativas da membrana eritrocitária, devido à liberação de enzimas hidrolíticas durante o armazenamento que alteram as glicoproteínas da membrana. A leucorredução ou deleucotização por filtros remove mais de 99,9% de leucócitos do componente original [1, 5]. Desta forma entre outras vantagens, tais como a redução da sensibilização contra antígenos leucocitários, a deleucotização pode também prevenir os danos da membrana eritrocitária por enzimas leucocitárias.

Foi estabelecida uma metodologia para avaliar o ζ de hemácias em diferentes condições, a qual poderá contribuir na padronização de técnicas de hemaglutinação utilizando diferentes meios potencializadores e proporcionar melhor conhecimento sobre as lesões de membrana em hemácias durante o período de armazenamento com diversos meios conservantes.

Acredita-se que a metodologia proposta para medir o potencial Zeta, usando pinças ópticas, pode ser estendida para outros tipos de células, onde o ζ seja um parâmetro importante. As células nos organismos multicelulares são carregadas e cercadas de soluções eletrolíticas. O potencial Zeta pode, por exemplo, ser utilizado para diferenciar células de baixo potencial metastático de células de alto potencial metastático [6].

AGRADECIMENTOS

À Fundação HEMOPE nas pessoas de Raul Melo, Frida Reffert, Aderson Araujo, Ana Maria do Nascimento e Roberto Porpino que colaboraram para realização desta pesquisa, ao HEMOCENTRO (UNICAMP) e as seguintes agências financiadoras: L'oreal, ABC, UNESCO, CAPES, CNPq e FACEPE.

REFERÊNCIAS

- 1- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. Technical Manual AABB. 16th ed., Bethesda, Maryland, 2008.
- 2- ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; BJORKHOLM, J. E. & CHU, S. - Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optic. Lett.*, 11: 288 - 290, 1986.
- 3- BARJA-CASTRO, M. L.; BRANDÃO, M. M.; FONTES, A.; COSTA, F. F.; CÉSAR, C. L. & SAAD, S. T. O. - Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezers. *Transfusion*, 42 (9): 1196 - 1199, 2002.
- 4- BRANDÃO, M. M.; BARJA-CASTRO, M. L.; FONTES, A.; CÉSAR C. L.; COSTA, F. F & SAAD, S. T. O. - Impaired red cell deformability in iron defi-

- cient subjects. Clin. Hemorheol. and Microcirc., 43: 217 – 221, 2009.
- 5- BRUIL, A.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J. & VAN AKEN, W.G. – The mechanisms of leukocyte removal by filtration. Transfus. Med. Rev., 9: 145 – 66, 1995.
 - 6- CARTER H. B.; COFFEY D. S. – Cell-surface charge in predicting metastatic potential of aspirated cells from the dunning rat prostatic adenocarcinoma model. J. Urol., 140: 173–175, 1988.
 - 7- CHELIDZE, T. – Dielectric spectroscopy of blood. J. Non-Cryst. Solids, 305: 285–294, 2002.
 - 8- DINU, C.; Z.; CHAKRABARTY, T.; LUNSFORD, E.; MAUER, C.; PLEWA, J.; DORDICK, J. S & CHRISEY, D. B. – Optical manipulation of microtubules for directed biomolecule assembly. Soft Matter, 5: 3818–3822, 2009.
 - 9- EYLAR, E. H.; MADOFF M. A.; BRODY, O. V. & ONCLEY, J. L. – The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J. Biol. Chem., 237: 1992 – 2000, 1962.
 - 10- FONTES, A.; FERNANDES H. P.; THOMAZ, A. A.; BARBOSA L. C.; BARJA-CASTRO, M. L & CÉSAR C. L. – Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells with a Double Optical Tweezers. J. Biomed. Optics, 13: 014001.1 – 014001.6, 2008.
 - 11- GIRELLO, A. L. & KUHN, T. I. B. B. - Fundamentos da Imuno - Hematologia Eritrocitária. 2 Ed. Brasil. Senac Editora, 2007, 208 p.
 - 12- GUTKOWSKI, R. F.; DWORKIN, H. J. ; PORTER W. C. ; ROHWER H. Jr.- Radiolabeling of Red Blood Cells. The Journal of Nuclear Medicine, 17 (12): 1113 – 1114, 1976.
 - 13- HURUTA, R. R.; BARJA-CASTRO, M. L.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; FONTES, A.; BARBOSA, L. C., & CESAR, C. L. – Mechanical Properties of Stored Red Blood Cells Using Optical Tweezers. Blood, 92: 2975 – 2977, 1998.
 - 14- LALIBERTE, M.; BORDELEAU F.; MARCEAU, N & SHENG, Y. – Antigen detection at atomolar concentration using optical tweezers. Proc. SPIE, 7386: 09, 2009.
 - 15- NASCIMENTO, J. M.; SHI, L.; MEYERS S.; GAGNEUX, P.; LOSKUTOFF, N. M.; BOTVINICK E. L. & BERNS, M. W. – The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. J. R. Soc. Interface, 5 (20): 297–302, 2008.
 - 16- PERKINS T. T. – Optical traps for single molecule biophysics: a primer. Laser & Photon. Rev. 3: 203–220, 2009.
 - 17- POLLACK, W. & RECKEL, R. P. – A reappraisal of the forces involved in Hemagglutination. Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 54: 29–42, 1977.
 - 18- POZZO L.; FONTES A.; THOMAZ A. A.; SANTOS B. S.; FARIAS P. M. A.; COPI D.; GIORGIO S. & CESAR C. L. – Studying taxis in real time using optical tweezers: Applications for Leishmania amazonensis parasites. Micron, 40: 617–620, 2009.
 - 19- SAKATA, S. K.; KURACHI M & SOGAWA K. – Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. Eur. Biophys. J. Biophys., 27: 55–61, 1998.
 - 20- SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L. & LI, D. – Zeta-potential measurements using Smoluchowski equation and slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. J. Colloid Interface Sci, 261: 402–410, 2003.
 - 21- WANG, S. K.; CHIU, J. J.; CHEN, L. J.; LI, M. R.; CHOU, S. C. & HWANG, N. H. C. – Optical tweezers measurements of leukocyte-endothelium adhesion force. Asaio Journal, 50 (2): 166, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Diego César Nunes da Silva
 Rua Demócrito de Souza Filho, 300, apt. 1302 Bl. B, Madalena
 CEP. 50810-120 - Recife - PE

ProIN

Programa de Controle Interno da Qualidade

O PNCQ, fornece soro humano liofilizado para o controle interno em seu Laboratório.

Produção das amostras-controle é feita em estrutura própria do PNCQ

- Marcadores Tumorais
- Coagulação
- Gasometria
- Espectrofotometria

- Bioquímica
- Hormônios
- Marcadores Cardíacos
- Imunologia
- Urinálise
- Drogas Terapêuticas

Rua Vicente Licínio, nº 193 - Tijuca - Rio de Janeiro RJ | CEP: 20270-340 | Tel/Fax: 55 (0XX21) 2569-6867
 Email: pncq@pncq.org.br | Site: www.pncq.org.br

PNCQ
 Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

© asterisco designers

Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*

Evaluation of the antibacterial activity of extracts isolated from native plants of the Brazilian flora against *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*

Samuel Mendes de Cordova¹, Camila Simões Benfatti¹, Michele Debiasi Alberton Magina², Alessandro Guedes² & Caio Mauricio Mendes de Cordova²

RESUMO - Em vários grupos de microrganismos é crescente o número de cepas resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento. Da mesma forma, o interesse nas espécies de mollicutes vem aumentando constantemente, principalmente pelo fato de serem microrganismos peculiares responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças, e também pelos relatos constantes de aumento de resistência. Na busca de novos medicamentos, sabe-se que existem muitas plantas com excelentes potenciais medicinais, e que vêm sendo utilizadas pela medicina popular. Estas propriedades terapêuticas necessitam de trabalhos científicos que comprovem suas atividades. Desta forma, neste trabalho procurou-se analisar frente às espécies de mollicutes *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, a atividade antibacteriana in vitro de sete plantas nativas da Flora Brasileira que apresentaram propriedade contra outros tipos de microrganismos. Extratos brutos de *Hedyosmum brasiliense*, *Piper caldense*, *Piper lindbergii*, *Piper cernuum*, *Piper mollicomum*, *Serjania erecta* e *Rubus rosaefolius* foram testados através do método de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). Todas as plantas apresentaram atividade inibindo o crescimento bacteriano, com MICs variando de 5,0 mg/dL a 0,625 mg/dL, sendo que a planta *Serjania erecta* do Paraná foi a que apresentou os melhores resultados.

PALAVRAS-CHAVE - Mollicutes, mycoplasma, atividade antibacteriana, produtos naturais, plantas.

SUMMARY - Among several groups of microorganisms, the percentage of strains showing resistance to every antibiotic used in treatment continues to increase. In the same way, the interest over mollicute species is uprising, as they are exotic microorganisms responsible for a series of diseases, with increasing reports of antibiotic resistance. In the search for new drugs, it is known that we dispose of many plants with excellent therapeutic potential, in use by folk medicine. These plants often still lack of scientific work to prove their therapeutic properties. With this in mind, we have aimed to evaluate, against the mollicute species *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*, the in vitro antibacterial activity of seven species of native plants species from the Brazilian flora which have shown the same properties with some bacteria. Whole plant ethanol extracts of *Hedyosmum brasiliense*, *Piper caldense*, *Piper lindbergii*, *Piper cernuum*, *Piper mollicomum*, *Serjania erecta* and *Rubus rosaefolius* were evaluated through the broth microtitration method to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). All plant extracts presented antimicrobial activity inhibiting bacterial growth with MICs varying from 5.0 mg/dL to 0.625 mg/dL, being *Serjania erecta* from the Paraná state the most active plant.

KEYWORDS - Mollicutes, mycoplasma, antibacterial activity, natural products, plants.

INTRODUÇÃO

A necessidade da busca por novos tratamentos para infecções bacterianas é o grande desafio da medicina atual pelo aumento da resistência aos antimicrobianos, que a cada dia vem sendo mais evidente. Os mollicutes são os menores microrganismos capazes de auto-replicação, e uma de suas principais características é a ausência de parede celular (4). O interesse nas espécies de mollicutes vem aumentando constantemente, principalmente pelo fato de serem responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças importantes, como no caso de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* que possuem envolvimento na patogênese de infecções do trato urogenital, podendo levar à infertilidade. *M. arginini* é uma espécie que infecta ovinos, sendo responsável por grave doença respiratória nestes animais (1). Também existem relatos de infecção fatal por *M. arginini* no homem, podendo se constituir numa zoonose importante (16). Além disso, os relatos de aumento da resistência dos mollicutes aos antibióticos utilizados no tratamento são significantes (13). Assim, a busca por novas substâncias que possam gerar medicamentos capa-

zes de combater as infecções por estes e outros microrganismos se faz mister. Devido a enorme biodiversidade brasileira, o estudo das propriedades medicinais das plantas de nossas florestas constitui-se grande oportunidade na área da microbiologia e dos produtos naturais.

Em um levantamento bibliográfico etnobotânico sobre plantas utilizadas pela população brasileira no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas, foram citadas 490 espécies. A família Piperaceae foi uma das mais testadas para a atividade antifúngica em um programa de triagem de plantas latino-americanas (8). Nesta triagem foi observado que o maior número de resultados positivos concentra-se na família Piperaceae. Estudos realizados recentemente mostram que algumas espécies de *Piper* podem trazer muitos benefícios, como propriedades analgésicas e energéticas; promover vasodilatação, ter ação antioxidante, antifúngica, anticâncer e antiinflamatória (2). A planta *Serjania erecta* (nome popular Cinco Folhas), pertencente à família Sapindaceae e à Ordem Sapindales, é uma planta do cerrado de uso popular principalmente nos estados do Mato Grosso, Tocantins, Goiás e Distrito Federal utilizada para como diuréticas, estimulante físico e

Recebido em 23/04/2009

Aprovado em 04/08/2010

¹Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

²Professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau. Campus III - Rua São Paulo, 2171, Itoupava Seca - Blumenau / SC - 89.030-000.

mental, cicatrizantes de úlceras, anti-inflamatória, entre outros (6). A biodiversidade de espécies vegetais do cerrado é enorme e o potencial de pesquisa científica é igualmente vasto. Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da bioatividade de plantas medicinais de cerrado fornece subsídios para utilizá-las como fármacos pelo homem (5). Assim por sua popularização e uso torna-se extremamente importante a análise e identificação de seus principais compostos para a verificação de presença de substâncias que justifiquem sua atividade e uso popular.

Rubus rosaeifolius Smith, conhecida popularmente como amora, amora silvestre, amora brava, amora de São Francisco, amora do campo, amora do mato e amora branca, vem sendo popularmente usada como hipoglicemiante, antihiperlipidêmico, regulador dos níveis hormonais e como antimicrobiano (9). Estudos demonstram a atividade antimicrobiana da planta *Hedyosmum brasiliense* contra espécies de microrganismos muito conhecidos, a exemplo de algumas dos gêneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, dentre outras (10). Possui ainda atividade antifúngica superior ao Fluconazol em testes *in vitro* contra espécies do gênero *Cândida* (2).

Entretanto, ainda não foi relatada a eventual atividade antimicrobiana destas plantas nativas da flora brasileira contra espécies de mollicutes, microrganismos peculiares responsáveis por uma série de doenças no homem, nas plantas e nos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS. Os microorganismos utilizados foram cepas de referência de *Mycoplasma hominis* (ATCC 23114) e *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27618), e *Mycoplasma arginini* (PG18). O ureaplasma foi cultivado em meio de cultura U10 (14), e os micoplasmas em meio líquido de Arginina - MLA (15), e incubados 37° C ± 1° C por 48 horas em microaerofilia.

PLANTAS. Foram utilizados extratos brutos das partes aéreas das plantas da Mata Atlântica *Hedyosmum brasiliense*, *Piper caldense*, *Piper lindbergii*, *Piper cernuum*, *Piper mollicomum*, *Rubus rosifolius*, além de *Serjania erecta* do Cerrado. Também foi utilizada uma variedade de *Serjania erecta* cultivada no estado do Paraná. O material vegetal foi submetido à secagem a 40°C em estufa com circulação de ar. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas.

EXTRATOS VEGETAIS. Os extratos foram preparados a partir de folhas secas trituradas deixadas em maceração em uma solução hidroalcoólica 70%. Esse processo ocorreu durante 7 (sete) dias em um recipiente de vidro, fechado e protegido da luz. Em seguida, os extratos foram concentrados em um evaporador rotatório sobre pressão reduzida, com uma temperatura controlada de 45°C, e posteriormente secos com o auxílio de um jato de ar aquecido e de um dessecador (7). Os extratos foram então dissolvidos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e testados através do método de microdiluição em concentrações variando de 5 mg/mL a 0,0391 mg/mL, frente às cepas de mollicutes. Depois de solubilizados, os extratos foram filtrados com filtros Millipore (Millipore) de 0,22 um para esterilização, tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido à sua

riqueza em nutrientes. Inicialmente, foi testada a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas (100 mg) dissolvidos em 10 mL de DMSO, solvente normalmente inerte no crescimento de bactérias, como *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Klebsiela* sp.(5).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. Os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) foram realizados por um método padronizado de microdiluição em caldo, em placas de 96 cavidades (3). Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos de planta, onde a 100 µL de meio de cultura MLA ou U10 foram adicionados 100 µL de extrato; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se uma gama de concentração de extrato de planta (inicialmente à 10 mg/mL) diluída em razão 2 (5 mg/mL na segunda cavidade; 2,5 mg/mL na terceira cavidade, e assim sucessivamente). A esta gama de concentrações de extratos de plantas, foram adicionados 100 µL de um inóculo de cultura de mollicutes em fase *log* de crescimento, contendo 10³ microrganismos/mL. Como controle, foi feita uma diluição seriada do próprio solvente (DMSO), sem extrato de planta, e uma diluição seriada da cultura do microrganismo, sem a adição de solvente ou de extrato de planta. Por fim, adicionou-se em todas as cavidades 2 a 3 gotas de vaselina líquida para isolar cada cavidade do meio externo, e criar um ambiente de microaerofilia. As placas foram incubadas a 37° C ± 1° C por 48 horas, e o crescimento foi observado a partir da mudança de cor do meio de cultura, devido à presença do indicador vermelho de fenol. Os microrganismos degradam uréia (ureaplasmas) ou arginina (*M. hominis* e *M. arginini*) produzindo amônia e alcalinizam o pH do meio, fazendo com que haja uma mudança de cor do amarelo para o vermelho, indicando o crescimento bacteriano. Não há turvação do meio de cultura, em razão de seu diminuto tamanho celular. Todos os procedimentos foram realizados de maneira estéril em capela de fluxo laminar.

RESULTADOS

Nos primeiros testes para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de plantas solubilizados em DMSO, frente à *M. arginini*, foi possível observar uma grande atividade de *Piper caldense* e *Piper mollicomum* na inibição do crescimento bacteriano. Entretanto, observando o controle do solvente, pudemos verificar que o DMSO por si só, diluído até 1:8, era capaz de inibir o crescimento do micoplasma. Desta forma, foi necessário solubilizar os extratos das plantas em DMSO a 10% em água, para evitar o efeito do solvente sobre a inibição do crescimento bacteriano. Assim, foi possível avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos das plantas contra as espécies de mollicutes, conforme se pode observar na figura 1, através do teste de microdiluição em caldo. Foram utilizados os extratos brutos das plantas *Piper caldense*, *Piper lindbergii*, *Piper cernuum*, *Piper mollicomum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Serjania erecta* (Paraná), *Serjania erecta* (Cerrado), *Rubus rosifolius*, em diluições seriadas de 5,0 a 0,0391 mg/mL. Desta forma, foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos diferentes extratos brutos de plantas, de acordo com a tabela 1.

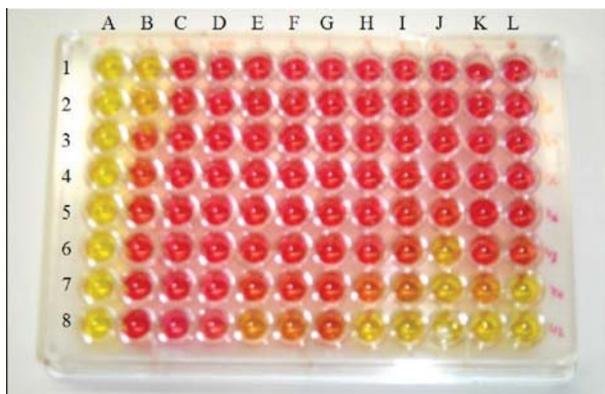


Figura 1. Método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das plantas *Piper caldense* (E), *Piper lindbergii* (F), *Piper cernuum* (G), *Piper mollicomum* (H), *Hedyosmum brasiliense* (I), *Serjania erecta* (Paraná) (J), *Serjania erecta* (Cerrado) (K), *Rubus rosifolius* (L) contra *U. urealyticum*. Coluna A (1-8): controle do meio (somente meio de cultura sem adição de inóculo), Coluna B: controle do inóculo (diluição seriada do inóculo de razão 2); Coluna C: controle do solvente, diluição seriada de razão 2 do DMSO 10%; Coluna D: controle do diluente, diluição seriada de razão 2 de H₂O.

TABELA I
Atividade antimicrobiana representada pela Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos das plantas contra as espécies de mollicutes.

Planta	MIC do Extrato Bruto (mg/mL)		
	<i>M. arginini</i>	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
<i>Piper caldense</i>	2,5	5,0	5,0
<i>Piper lindbergii</i>	2,5	>5,0	5,0
<i>Piper cernuum</i>	2,5	>5,0	5,0
<i>Piper mollicomum</i>	2,5	5,0	1,25
<i>Hedyosmum brasiliense</i>	1,25	5,0	1,25
<i>Serjania erecta</i> (Paraná)	0,625	2,5	0,625
<i>Serjania erecta</i> (Cerrado)	1,25	5,0	1,25
<i>Rubus rosifolius</i>	1,25	5,0	1,25

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pelo o processo de solubilização dos extratos brutos, após a adição de 9 mL de água ao extrato solubilizado em 1 mL de DMSO, naturalmente acabamos testando somente substâncias presentes no extrato que se mantiveram solúveis em DMSO 10% em água. Assim, na realidade, não partimos exatamente de extratos na concentração de 10 mg/mL nos testes de atividade antimicrobiana, mas sim em concentração muito menor, devido a perda de material precipitado, no momento de esterilização. Esta observação é bastante importante, pois indica que a atividade antimicrobiana do extrato de *Serjania erecta*, 0,625 mg/mL contra *U. urealyticum* e *M. arginini* certamente é ainda mais potente, considerada a perda de extrato durante o processo de solubilização e filtração.

Com os dados obtidos, pudemos observar que o DMSO exerce um efeito tóxico sobre o crescimento de *M. arginini*, ao contrário do observado com espécies de bactérias típicas, como *Pseudomonas* sp, *E. coli*, e *Staphylococcus* sp (5). Este fato provavelmente é devido à característica peculiar dos mollicutes, os menores microrganismos capazes de auto-replicação, desprovidos de parede celular, assemelhando neste sentido às células dos microrganismos eucariotos. Pode-se verificar facilmente que todos os extratos das plantas *Hedyosmum brasiliense*, *Piper caldense*, *Piper lindbergii*, *Piper cernuum*, *Piper mollicomum*, *Serjania erecta* e *Rubus rosifolius* possuem atividade antimicrobiana com ao menos um título de diluição superior ao solven-

te utilizado. As dificuldades no cultivo destes microrganismos explicam em parte a escassez de publicações relacionadas à avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais contra espécies de mollicutes.

Nota-se que os extratos das plantas utilizadas neste estudo apresentam menor atividade sobre *M. hominis* em comparação com as outras espécies de mollicutes analisadas, com um MIC máximo de 2,5 mg/dL para a *Serjania erecta* do Paraná. Ainda não está clara a razão desta diferença, mas pode-se especular que talvez seja devida ao mecanismo de ação dos antimicrobianos presentes nestes extratos. *M. hominis* é uma espécie de mollicute naturalmente resistente à eritromicina, por mecanismo já conhecido (12). Deve ser investigado se estes produtos naturais presentes nos extratos destas plantas eventualmente apresentam um mecanismo de ação semelhante.

A família Piperaceae tem mostrado uma grande diversidade de metabólitos secundários com marcantes atividades biológicas, incluindo alcalóides, amidas, flavonóides, ácido benzóico e seus derivados, terpenos e ciclopentanodionas. Resultados anteriores (11) relatam a presença de heterosídeos antraquinônicos (tanto C-heterosídeo como O-heterosídeo), antraquinonas livres, saponinas, taninos, flavonóides, heterosídeos cianogênicos, cumarinas, alcalóides, açúcares redutores e não redutores e heterosídeos cardioativos (núcleo esteroidal lactona desoxiaçúcares), tanto nas partes aéreas e subterrâneas de *Rubus rosaefolius*.

É importante ressaltar que os testes foram realizados com os extratos hidro-alcoólicos brutos, e a realização de testes com as sub-frações destes extratos, e principalmente com componentes purificados, certamente devem apresentar resultados ainda melhores. A adequação da solubilização dos extratos, bem como a utilização de frações purificadas dos mesmos, promete ser uma abordagem inovadora e promissora na busca de novos compostos antimicrobianos para o tratamento das infecções causadas pelos mollicutes. No momento, estamos conduzindo estudos visando à identificação e purificação dos componentes destes extratos de plantas, de modo a identificar novos compostos com potencial antimicrobiano. Estes são os primeiros relatos de atividade antimicrobiana de extratos destas plantas nativas da Mata Atlântica e do Cerrado contra espécies de microrganismos da classe Mollicutes.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/CNPq pelo apoio financeiro aos bolsistas S. M. de C. e C. B. durante a realização deste projeto.

REFERÊNCIAS

1. Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RA. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet. Rec.*, 155(14): 413-6, 2004.
2. Baumgart AMK. Avaliação da atividade das espécies *Piper mollicomum* e *Hedyosmum brasiliense* frente a espécies de *Candida* spp. 2007.63 f, il. Trabalho de Conclusão de Curso - (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2007. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/MO/2007/326695_1_1.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2008.
3. Bebear C, Robertson J. Determination of the minimal inhibitory concentration. In: Tully, J. G. e Razin, S., eds. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. 1 ed. Vol. II. Academic Press, San Diego, p. 189-97, 1996.
4. Cordova CMM, Cunha RAF. da. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. *J. Brás. Patol. Med. Lab.*, 38(2): 119-

126, 2002.

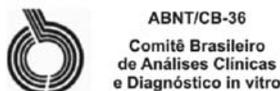
5. Dalmarco EM, Guimarães CL, Guedes A, Calderari MT. Análise da atividade antibacteriana (in vitro) de plantas da flora brasileira utilizados pela medicina popular. *Revista Ciências da Saúde*, 25: 133-142, 2007.
6. Guarim Neto G, Santana SR, Silva JVB. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. *Acta Botânica Brasileira*, 14(3): 327-334, 2000.
7. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman & Hall, London, 1998.
8. Lago JHG, Tanizaki TM, Young MCM, Guimarães, EF, Kato MJ. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prelis) C. DC. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(2): 153-156, 2005.
9. Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Plantarum, Nova Odessa: 2002.
10. Makowski TJ. Avaliação da atividade antibacteriana (in vitro) de extratos e frações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. miq. através da metodologia de microdiluição em caldo. 2006.47 f. il. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Regional de Blumenau, Curso de Farmácia, Blumenau, 2006. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/MO/2006/312536_1_1.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2008.
11. Mauro C, Cardoso CMZ, Schultze C, Yamamichi E, Lopes PS, Marcondes EMC, Miranda JP, Arruda DAO, Frota M, Pacheco AL. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Rubus rosaefolius* Sm. - Rosaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12: 23-25, 2002.
12. Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57(4): 753-756, 2006.
13. Ruef C. Clinical relevance of antibiotic resistance in obstetrics and gynecology. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 45(1): 19-27, 2005.
14. Shepard MC. Standard fluid medium U10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 160-171, 1974.
15. Velleca WM, Bird BR, Forrester FT. Complete media for growth of mycoplasmas and ureaplasmas from the urogenital tract: arginine broth medium for growth of *M. hominis*. In: Velleca WM., Bird BR, Forrester FT. *Laboratory diagnosis of mycoplasma infections: course 8226-C*. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare, C.D.C., p.120, 1979.
16. Yechouron A, Lefebvre J, Robson HG, Rose DL, Tully JG. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. *Clin. Infect. Dis.*, 15(3): 434-8, 1992.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Caio MM. Cordova
Rua São Paulo, 2171
CEP. 89030-000 - Blumenau - SC
E-mail: cmcordova@furb.br



A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas patrocina e promove os seguintes programas e produtos:



Asociación Mercosur de Normalización



SBAC *Jornal*



Participe você também. Associe-se! www.sbac.org.br

Frequência de grupos sanguíneos dos sistemas AB0 e Rh na população de Belo Horizonte-MG*

Frecuence of ABO and Rh blood groups in the population of Belo Horizonte-MG

Eduardo Antonio Ferraz Coelho^{1,2}, Rejane Silva Diniz¹, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis¹ & Karina Braga Gomes¹

RESUMO - A frequência de grupos sanguíneos dos sistemas AB0 e Rh são variáveis entre as diversas populações do mundo. No período de 1999 a 2007, no Setor de Patologia Clínica do Colégio Técnico da UFMG, foi realizada a tipagem sanguínea nos sistemas AB0 e Rh em uma amostra populacional representada por 4.800 pessoas, por meio da coleta de amostras de sangue por punção digital e/ou coleta venosa, de indivíduos residentes em Belo Horizonte e sua região metropolitana. Os resultados revelaram uma frequência média de 38% para o grupo sanguíneo do tipo A; 12% para o grupo B; 4% para o grupo AB e 46% para o grupo O. Na determinação do Fator Rh, a frequência encontrada foi de 93% para o grupo Rh⁺ e 7% para Rh⁻. Dessa forma, por meio de uma amostragem significativa populacional, observou-se que o tipo sanguíneo O/Rh⁺ é o mais encontrado em Belo Horizonte e região metropolitana.

PALAVRAS-CHAVE - Grupos sanguíneos, classificação sanguínea, estudo epidemiológico.

SUMMARY - The frequency of the blood groups of the ABO and Rh systems varies among the populations in the world. In the period from 1999 to 2007, in the Sector of Clinical Pathology of Coltec of UFMG, was realized the blood group classification of the ABO and Rh groups in about 4.800 people through the blood collection of coming individuals from Belo Horizonte and metropolitan area. This study revealed a medium frequency of 38% for blood group A; 12% for group B; 4% for group AB and 46% for group O. In relation to the determination of the factor Rh, it was found frequency of 93% to Rh⁺ and 7% for Rh⁻. In this way, was observed that the O and Rh⁺ blood groups were the most predominant in the population represented by Belo Horizonte and metropolitan area.

KEYWORDS - Blood groups, blood classification, epidemiological study.

INTRODUÇÃO

Os grupos sanguíneos existentes na espécie humana manifestam-se pelas proteínas expressas na membrana externa de células sanguíneas (1) e tais antígenos constituem-se como marcadores genéticos relevantes e seu reconhecimento individual apresenta importância em diversas áreas da medicina aplicada (2, 3, 4).

Dentre os grupos sanguíneos existentes, o sistema AB0 apresenta-se com destaque, uma vez que há expressão abundante de seus antígenos na superfície de células sanguíneas e as proteínas A e B. Os anticorpos naturais do sistema AB0 são produzidos pelo organismo logo após o nascimento, normalmente a partir do 3º mês de idade, atingindo seu ápice na adolescência (5).

A frequência dos grupos sanguíneos do sistema AB0 varia entre as diversas populações no mundo. Vários trabalhos vêm demonstrando a associação dos mesmos à susceptibilidade e/ou resistência às doenças; dessa forma, possibilitando sua utilização como marcadores epidemiológicos de fatores de risco (6, 7, 8, 9, 10).

O grupo O foi o tipo sanguíneo existente nos primórdios da humanidade e é, atualmente, ainda o mais freqüente. Estudos epidemiológicos correlacionaram o grupo O a uma maior predisposição para o desenvolvimento de úlcera duodenal e leucemia linfoblástica aguda (11). Outros trabalhos, por sua vez, correlacionam a incidência do grupo A com a susceptibilidade à infecção por *Giardia lamblia* (12) e no desenvolvimento de carcinoma gástrico (12, 13), bem como os grupos sanguíneos não O ao aumento da frequência de eventos trombóticos e acidente vascular cerebral hemorrágico (14). Naturalmente, outros fatores contribuem para tal incidência, entretanto, a correlação direta dos diferentes grupos sanguíneos com a maior ocorrência de doenças, torna-se um fator cujo conhecimento não deve ser desprezado (15). O sistema Rh é caracterizado pela expressão do antígeno D na superfície das células sanguíneas. Entretanto, uma par-

cela significativa da população que não desenvolve reação de aglutinação nos testes normalmente utilizados, pode expressar o antígeno D em níveis diminuídos sendo então classificadas, erroneamente, como pessoas do tipo Rh⁻ (16). Dessa forma, há a necessidade do conhecimento e da classificação correta deste sistema, a fim de se evitar tipagens sanguíneas errôneas e, conseqüentemente, expor o paciente a riscos desnecessários.

Neste trabalho, foi realizado o levantamento epidemiológico da frequência dos grupos sanguíneos dos sistemas AB0 e Rh em uma amostra significativa da população de Belo Horizonte e região metropolitana, representada por um contingente de 4.800 pessoas. Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que o tipo sanguíneo O e Rh⁺ são os mais freqüentes encontrados na população, coincidente com a evolução humana, embora a frequência do grupo A tenha aumentado significativamente no decorrer das últimas décadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta da amostra foi realizada por punção digital. Participaram deste estudo 4.800 pessoas atendidas no período de 1999 a 2007, durante os eventos de extensão oferecidos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) à comunidade acadêmica e externa. Não houve nenhum critério de exclusão para a participação neste estudo, sendo observados indivíduos de todas as faixas etárias.

TIPAGEM SANGÜÍNEA

Sistemas AB0 e Rh

Gotas de sangue foram transferidas para lâminas de microscopia e foram acrescentados os anticorpos anti-A, anti-B e anti-D (DIAMED®). As amostras foram homogeneizadas e processadas sob condições de aquecimento para a verificação de aglutinação e a classificação do respectivo grupo sanguíneo.

Recebido em 22/04/2009

Aprovado em 29/07/2010

¹Setor de Patologia Clínica, Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais.*

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Pesquisa do fator D⁺

As hemácias presentes nas amostras de sangue venoso coletadas foram separadas e lavadas por três vezes, utilizando-se solução salina 0.85% estéril. Os anticorpos anti-D foram acrescentados e o material foi processado sob aquecimento. Verificou-se, então, a ocorrência ou não de aglutinação. Em caso negativo, o soro de Coombs foi adicionado e a amostra foi centrifugada para verificação da aglutinação. Nos casos de aglutinação, o indivíduo foi considerado D⁺, na ausência da mesma, D⁻.

RESULTADOS

O trabalho foi realizado no período de 1999 a 2007, no Setor de Patologia Clínica do COLTEC da UFMG, envolvendo 4.800 pessoas provenientes do município de Belo Horizonte e região metropolitana.

Os resultados revelaram a frequência de 38% para o grupo A; 12% do grupo B; 4% do grupo AB e 46% do grupo O (Figura 1A).

Na determinação do Fator Rh, a frequência encontrada foi de 93% para o grupo Rh⁺ e 7% do grupo Rh⁻ (Figura 1B). Em relação aos indivíduos que apresentaram reação negativa na pesquisa do Fator Rh, a pesquisa do fator D⁺ foi realizada e constatou-se que cerca de 10% dos indivíduos apresentaram reação positiva, dessa forma, sendo classificados como indivíduos D⁺.

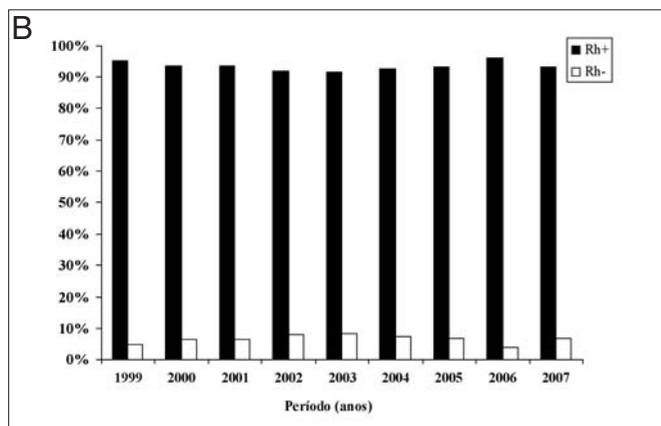
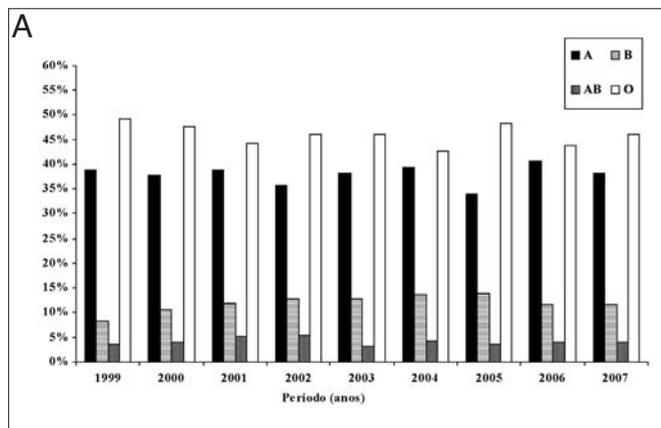


FIGURA 1- Frequência dos grupos sanguíneos dos sistemas ABO (A) e Rh (B) em indivíduos residentes no município de Belo Horizonte e região metropolitana, avaliada no período de 1999 a 2007.

DISCUSSÃO

Os sistemas de grupos sanguíneos humanos são caracterizados pela expressão de proteínas na membrana externa de células sanguíneas, notadamente as hemácias e são importantes em diversas aplicações da medicina tradicional.

Na análise dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se constatar uma variação percentual mínima entre os grupos avaliados durante os diferentes anos do estudo, demonstrando a não-existência de variabilidade da população durante o período avaliado, mesmo tratando-se de pessoas com etnias diferentes.

Os resultados demonstraram que, apesar de ter sido o único grupo existente nos primórdios da humanidade e ainda ser o mais prevalente encontrado atualmente, o grupo sanguíneo O vem perdendo espaço em relação aos demais grupos, notadamente, em relação ao grupo A; o que denota a maior miscigenação entre os diferentes povos. Na avaliação do sistema Rh, pôde-se observar que grande parte da população apresenta o Fator Rh⁺. Há de se destacar ainda que, dos indivíduos que se comportaram nos exames inicialmente como Rh⁻, após a pesquisa do fator D⁺, 10% dos mesmos apresentaram reação positiva e foram classificados como indivíduos D⁺, fato considerado importante, especialmente, nos casos de transfusões sanguíneas.

Em um levantamento realizado pela Fundação Hemominas, no ano de 2006, foi observado um percentual de 36% de indivíduos do grupo sanguíneo A, 13% do grupo B, 4% do grupo AB e 47% do grupo O. Dessa forma, há uma relação estrita entre os valores percentuais observados pela Fundação Hemominas com aqueles valores apresentados neste trabalho (17).

Dessa forma, por meio da análise dos resultados, ressalta-se a importância de uma classificação e interpretação correta dos grupos sanguíneos da população, uma vez que há uma crescente miscigenação entre os povos, o que faz com que a prevalência de determinados grupos tenda a sofrer uma variação na sua frequência.

Além disso, o conhecimento da frequência dos grupos sanguíneos na população de Belo Horizonte e região metropolitana é de grande importância, uma vez que pode nortear o trabalho nos Centros de Hemoterapia, bem como prevenir nesta população o desenvolvimento de várias doenças relacionadas ao grupo sanguíneo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Alair Flor de Maio pelo apoio técnico. Este trabalho foi realizado com suporte financeiro da Pró-Reitoria de Extensão (PROEX) da UFMG.

REFERÊNCIAS

- MILLAND, J. & SANDRIN, M. S. - ABO blood groups and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue antigens.*, 68:459-466, 2006.
- HOFMANN, R.; BENZ, E. J.; SHATILL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E & MCGLAVE P. - Hematology: basic principles and practice. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000.
- DAS, P. K.; NAIR, S. C.; HARRIS, V. K.; ROSE, D.; MAMMEN, J. J.; BOSE, Y. N. & SUDARSANAN, A. - Distribution of ABO and Rh-D blood groups among blood donors in a tertiary care centre in South India. *Trop. Doc.*, 31:47-48, 2001.
- BORGES, M. R.; ROBISON, M. & WANYCE, O. - Genética humana. São Paulo, Artmed, 2001.
- CARVALHO, W. F. - Técnicas médicas de Hematologia e ImunoHematologia. Belo Horizonte, Coopmed, 2002.

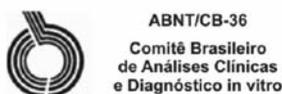
6. REID, M. E. & BIRD G. W. - Associations between human red cell blood group antigens and disease. *Transfus. Med. Rev.*, 4:47-55,1990.
7. JESCH, U.; ENDLER, P. C.; WULKERSDORFER, B. & SPRANGER, H. ABO blood group. Related investigations and their association with defined pathologies. *Sci. World J.*, 10:1151-54,2007.
8. LOSCERTALES, M. P.; OWENS, S.; O'DONNELL, J.; BUNN, J.; BOSCH-CAPBLANCH, X. & BRABIN, B.J. - ABO blood group phenotypes and *Plasmodium falciparum* malaria: unlocking a pivotal mechanism. *Adv. Parasitol.* 65:1-50, 2007.
9. MORAN, A. P. - Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr. Res.*, 343:1952-1965, 2008.
10. WU, O.; BAYOUMI, N.; VICKERS, M. A. & CLARK, P. - ABO (H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analyses. *J. Thromb. Haemost.*, 6: 62-69, 2008.
11. VADIVELU, M. K.; DAMODARAN, S.; SOLOMON, J. & RAJASEHARAN, A. - Distribution of ABO blood groups in acute leukaemias and lymphomas. *Ann Hematol.*, 83: 584-587, 2004.
12. EL GANAYNI, G. A.; ATTIA, R. A. & MOTAWEA, S. M. - The relation between ABO blood groups, HLA typing and giardiasis in children. *J. Egypt Soc Parasit.* 24: 407-412, 1994.
13. ALAVI, S. - Distribution of ABO Blood groups in childhood acute leukaemia. *Pediatric Hematol. Oncol.*, 23:611-617, 2006.
14. WIGGINS, K. L.; SMITH, N. L.; GLAZER, N. L.; ROSENDAAL, F. R.; HECKBERT, S. R.; PSATY, B. M.; RICE, K. M. & LUMLEY, T. - ABO genotype and risk of thrombotic events and hemorrhagic stroke *J Thromb Haemost.*, 7:263-269, 2009.
15. DANIELS, G. - Human blood groups. Oxford, Blackwell Publishing, 2002.
16. CARVALHO, M. G. & SILVA, M. B. - Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Belo Horizonte, Editora UFMG, 1988.
17. Folheto informativo de doação de sangue - 2006 da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (Hemominas) em: www.hemominas.mg.gov.br

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Eduardo Antonio Ferraz Coelho
 Setor de Patologia Clínica - COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha
 CEP: 31.270-901- Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
 Tel.: 55 31 3409-4983 Fax: 55 31 3409-4964
 E-mail: dudafercoelho@yahoo.com.br



A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas patrocina e promove os seguintes programas e produtos:



Asociación Mercosur de Normalización



Participe você também. Associe-se! www.sbac.org.br

Influência de tinturas de fruto cereja e verde de café no tratamento do Diabetes*

Influences of teinturerie of fruits cherry and green the coffee trait the Diabetes

Luciana Marques Cardoso¹, Tânia Toledo de Oliveira¹, Aloísio da Silva Pinto², Maria Aparecida Leão¹, Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves³, Marcelo Rocha da Costa¹, Marilane Kalyetta Almeida Fonseca¹, Ricardo Antônio Zatti¹ & Tanus Jorge Nagem⁴

RESUMO - O consumo de café tem sido associado à menor risco de diabetes. Entretanto, os compostos específicos e os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não estão claros. Realizou-se um experimento para avaliar o efeito das tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja da planta café (*Coffea arabica* L.) da variedade Catuaí Vermelho em ratos com diabetes induzido por aloxano. Após 30 dias de tratamento, foram coletadas amostras de sangue dos animais para dosagens séricas de glicose, colesterol e triglicérides. As tinturas de casca cereja (1,0 mL), fruto verde (0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL) e fruto cereja (1,0 mL e 2,0 mL), promoveram aumento significativo nos níveis de colesterol, quando comparado ao grupo doente não tratado. Com relação aos níveis de glicose e triglicérides, observou-se que todas as tinturas reduziram significativamente os valores séricos destes parâmetros. As percentagens de redução das concentrações de glicose e triaglicérides variaram entre -28% a -49% e -27% a -47%, respectivamente. A diminuição dos níveis de glicose e triglicérides se sobrepõe ao aumento observado do colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras como adjuvantes no tratamento da diabetes.

PALAVRAS-CHAVE - tinturas, café, diabetes

SUMMARY - The coffee consumption has been associated with a lower risk of diabetes. However, the specific components and the responsible mechanism for this effect are not clear yet. An experiment was made to evaluate the tinctures of cherry bark, rawed fruit and the cherry fruit of the coffee plant (*Coffea arabica* L.) of the "Red Catuaí" variety, in rats with induced diabetes, by administration of alloxan. After 30 days of treatment, blood samples of the animals were collected for serum glucose, cholesterol and triglycerides. The tinctures of cherry bark (1,0mL), rowed fruit (0,5mL and 2.0 mL), cherry fruit (1,0 mL and 2,0 mL), promoted a significant increase in the levels of cholesterol compared to the sick group not treated. All the tinctures reduced significantly the levels of glucose and triglycerides. The percentages of reduction of the glucose and triglycerides concentrations varied between -28% to -49% and -27% to -47%, respectively. The decrease of the glucose and triglycerides levels overlap the observed cholesterol increase, indicating that these tinctures can be promising as adjuvants in the treatment of diabetes.

KEYWORDS - teinterurerie, coffee, diabetes

INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas causado por secreção inadequada e/ou diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina. O efeito no metabolismo decorre da tentativa de garantir o aporte adequado de glicose para as células. Consequentemente há o aumento da glicemia, utilização de quantidades cada vez menores de glicose e mobilização crescente de proteínas e lipídeos⁽¹⁾. A diabetes ocasiona complicações vasculares e neuropatias. Juntos, o acidente vascular cerebral e coronariopatias fazem da diabetes a sétima causa de óbitos no mundo desenvolvido⁽²⁾. Pelo impacto socioeconômico, o DM vem sendo reconhecido, em vários países, como problema de saúde pública com reflexos sociais importantes⁽³⁾. Estima-se que em 2000 havia aproximadamente 150 milhões de pessoas no mundo com diagnóstico da doença e é provável que este número alcance o dobro em 2025⁽⁴⁾. Na Europa, o número de diabéticos em 1994 era de 16 milhões e poderá chegar 24 milhões em 2010⁽⁵⁾. Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que mais de 18 milhões de norte-americanos seja portadores de diabetes e que a diabetes tipo 2 corresponde a mais de 90% desse total.

As pesquisas sobre os fatores dietéticos e o risco de diabetes tipo 2 (DM2) focaliza os macronutrientes. Entretanto, micronutrientes e fitoquímicos também podem afetar o metabolismo da glicose⁽⁶⁾.

Evidências epidemiológicas sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2⁽⁷⁾. VAN DAN & HU⁽⁸⁾, em uma revisão sistemática sobre o consumo de café e o risco de DM2 identificaram vários estudos de coorte, incluindo 193.473 participantes e 8.394 casos de DM2. Foram encontrados risco relativo de 0,65 (95% de intervalo de confiança) para o maior consumo de café (≥ 6 ou ≥ 7 xícaras por dia) e 0,72 (95% de intervalo de confiança) para o segundo maior consumo (4-6 xícaras por dia) comparado com o menor consumo do produto (0 ou ≤ 2 xícaras por dia), ou seja, os participantes que consumiam 4 a 6 xícaras de café por dia ou maior ou igual a 6 a 7 xícaras tiveram 28% e 35%, respectivamente, menor risco de desenvolverem DM2 comparados com aqueles que consumiam de 0 a 2 xícaras de café por dia.

O café é constituído por cafeína, trigonelina, minerais, ácido clorogênico, ácidos alifáticos, ácido quínico, flavonóides (caempferol, quercetol), carboidratos, aminoácidos totais, aminoácidos livres e lipídeos⁽⁹⁾. Diferenças na composição entre os grãos verdes e torrados, bem como nas espécies e nos procedimentos de extração para preparo da bebida, resultam numa grande diversidade da composição química do produto final^(10,11).

Substâncias presentes no café, como cafeína⁽¹²⁾, ácido clorogênico⁽¹³⁾, magnésio⁽¹⁴⁾ e trigonelina⁽¹⁵⁾ podem afetar o metabolismo de glicose em animais e humanos. Durante o processo de torrefação do café, pode ocorrer a degradação de algumas dessas substâncias, como o ácido clorogênico e a trigonelina. A trigonelina é parcialmente degradada na

Recebido em 30/06/2009

Aprovado em 24/08/2010

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório Biofarmacos

²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária.

³Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Nutrição e Metabolismo

⁴Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Química, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais

torrefação e ocorre a decomposição do ácido clorogênico com formação do aroma volátil, material polimérico (melanoidina) e CO₂. Apesar de termicamente estável, também pode ocorrer pequenos decréscimos de cafeína⁽¹⁶⁾. Assim, os efeitos benéficos da planta café podem ser superiores ao da bebida no tratamento e prevenção da diabetes.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tinturas obtidas a partir de *Coffea arabica* L. da variedade Catuaí Vermelho em ratos com diabetes induzida por aloxano.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foram utilizados 132 ratos machos da raça Wistar, com 45 dias de idade, com peso médio de 250 g, oriundos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo seis animais, em ambiente climatizado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Labina - Purina®) e água "ad libitum".

Após um período de adaptação de 05 dias, os animais permaneceram em jejum de 16 horas para a indução do diabetes, que consistiu na administração de aloxano (Alloxan Monohydrate Sigma®), também conhecido como 2,3,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratada a 15% p/v diluído em solução de NaCl a 0,9% na dose de 60 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Em seguida, para evitar a morte dos animais por hipoglicemia, os ratos receberam uma solução hipersaturada de glicose a 90% por 2 dias.

Sete dias após a aplicação do aloxano, parte dos animais foram sacrificados, após jejum de 12 horas, para a determinação dos níveis séricos de glicose. Verificou-se que todos os animais que receberam o aloxano ficaram diabéticos (glicose acima de 180 mg/dL). Foram utilizadas tinturas do café *Coffea arabica* L. da variedade Catuaí Vermelho proveniente de propriedade particular, localizada na cidade de Coimbra-MG. Estas tinturas foram preparadas com 30 g do material diluído em 70 mL de água e 30 mL de álcool de cereal. A solução foi armazenada em vidro âmbar e agitada 2 vezes ao dia por aproximadamente 7 dias.

Os animais foram separados em grupos, aleatoriamente, conforme descrito no Quadro 1. O ensaio biológico teve a duração de 30 dias, sendo que todos os grupos receberam as tinturas por via oral (gavagem), com exceção do grupo diabético (grupo 1) e do grupo controle (grupo 2).

Ao final do tratamento, todos os animais foram sacrificados, devidamente anestesiados com ketamina (180 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), por via intraperitoneal. As amostras de sangue (cerca de 5 mL por animal) foram coletadas por punção cardíaca, colocadas em tubos de ensaio e centrifugadas por 15 minutos, para obtenção do soro. Foram analisados os níveis séricos de glicose, colesterol e triacilglicerol, utilizando kits da marca BIOCLIN e o equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

Na análise estatística, cada tratamento foi comparado ao grupo doente não tratado pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

RESULTADOS

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), apenas o G-9 (Aloxano + Fruto cereja 0,5 mL) reduziu o parâmetro colesterol, porém não foi estatisticamente significativo. Os

demais tratamentos aumentaram este parâmetro, sendo que no grupo casca cereja (1,0 mL), fruto verde (0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL) e fruto cereja (1,0 mL e 2,0 mL) este resultado foi significativo quando comparado ao grupo doente não tratado. Entretanto, com relação ao significado clínico destas variações, observou-se que os tratamentos com as tinturas de café não aumentaram as concentrações de colesterol ao ponto de desenvolverem uma hipercolesterolemia.

Os resultados dos valores médios de triacilglicerol estão apresentados na Tabela 1. Em todos os tratamentos (grupos 3 a 11) observou-se reduções (-27% a -47%) estatisticamente significativas, resultando em valores abaixo do apresentado pelo grupo normal. Os maiores decréscimos, -47%, -46% e -45%, foram observados no G-7 (Fruto verde 1,0 mL + Aloxano), G-3 (Casca cereja 0,5 mL + Aloxano) e no G-11 (Fruto cereja 2,0 mL + Aloxano), respectivamente. E a menor redução (-27%) ocorreu com o G-6 (Fruto verde 0,5 mL + Aloxano). É importante ressaltar, que o G-9, o único que não aumentou os níveis de colesterol, segundo a Tabela 1, promoveu uma diminuição de -43% dos níveis de triacilgliceróis. Assim, observa-se que todos os tratamentos, seja com tinturas de casca cereja, fruto verde ou fruto cereja da planta café, foram benéficos na redução de triacilgliceróis. Ademais, estas reduções são consideráveis do ponto de vista clínico e, possivelmente, estas tinturas poderão ser utilizadas no tratamento da hiperlipidemia.

Esta pode ser uma nova alternativa de uso para o fruto verde do café, que colhidos verdes podem causar prejuízos na colheita. Quando a colheita é feita em grande porcentagem de frutos verdes, são necessários mais litros de café colhido, gerando menor rendimento do que quando se colhe o café já maduro. Isto implica maior utilização de mão de obra, mais gastos com transporte e maior necessidade de área de terreiro para secagem, onerando os custos. A colheita de um fruto verde também necessita de maior esforço em relação a um maduro, o que provoca grande arranquio de folhas e galhos causando injúrias ao cafeeiro. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 1, observou-se que todos os tratamentos foram eficazes na redução da glicose comparados com o grupo de animais doentes não tratados (G-1), sendo estes resultados estatisticamente significativos. Os tratamentos não foram capazes de reduzir os níveis de glicose sanguínea ao ponto de levar os animais à normalidade. Porém, o período da intervenção foi apenas de 30 dias, o que pode não ter sido suficiente para que os animais atingissem níveis de glicose semelhantes ao grupo normal. O G-6 (Fruto verde 0,5 mL + Aloxano) foi o tratamento que mais influenciou na diminuição dos níveis glicose, reduzindo 49%, seguido pelos grupos 11 e 5, que apresentaram porcentagens de redução de 40 e 36%, respectivamente. Estas reduções são consideráveis para uso clínico, uma vez que pacientes com diabetes fazem uso de fármacos hipoglicemiantes por longos períodos. Portanto, as tinturas de casca cereja, fruto verde e fruto cereja da planta café são promissoras no tratamento da diabetes.

GRUPO	TRATAMENTO	DOSE(mL)
G-1	RAÇÃO + ALOXANO	-
G-2	RAÇÃO	-
G-3	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	0,5
G-4	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	1,0
G-5	RAÇÃO + ALOXANO + CASCA CEREJA	2,0
G-6	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	0,5
G-7	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	1,0
G-8	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO VERDE	2,0
G-9	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	0,5
G-10	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	1,0
G-11	RAÇÃO + ALOXANO + FRUTO CEREJA	2,0

Quadro 1: Descrição dos grupos avaliados.

TABELA I
Valores médios de colesterol, triacilglicerol e glicose (mg/dL)
em soro sanguíneo de ratos machos submetidos a diferentes
tratamentos e suas respectivas percentagens de variação

Tratamentos	Colesterol		Triacilglicerol		Glicose				
	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação			
G1 = Aloxano + Ração	93,40	A	0	104,03	A	0	343,37	A	0
G2 = Ração	103,68	B	+11	102,61	A	-1	112,83	B	-67
G3 = Aloxano + Casca cereja (0,5 mL)	96,21	A	+3	56,33	B	-46	229,05	B	-33
G4 = Aloxano + Casca cereja (1,0 mL)	107,77	B	+15	70,68	B	-32	241,82	B	-30
G5 = Aloxano + Casca cereja (2,0 mL)	98,36	A	+5	64,78	A	-38	218,27	B	-36
G6 = Aloxano + Fruto verde (0,5 mL)	107,24	B	+15	75,76	B	-27	176,38	B	-49
G7 = Aloxano + Fruto verde (1,0 mL)	99,06	B	+6	54,69	B	-47	246,02	B	-28
G8 = Aloxano + Fruto verde (2,0 mL)	108,88	B	+17	58,71	B	-44	245,39	B	-29
G9 = Aloxano + Fruto cereja (0,5 mL)	88,62	A	-5	59,47	B	-43	228,99	B	-33
G10 = Aloxano + Fruto cereja (1,0 mL)	115,12	B	+23	60,95	B	-41	241,54	B	-30
G11 = Aloxano + Fruto cereja (2,0 mL)	106,15	B	+14	57,42	B	-45	207,50	B	-40

Observação: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância o grupo doente não tratado (G1)

DISCUSSÃO

Como visto anteriormente, os níveis de glicose sanguínea e triacilglicerol, após 30 dias, foram maiores no grupo diabético não tratado, em relação ao grupo normal. Este resultado era esperado, visto que a droga utilizada para a indução da diabetes, o aloxano, promove o aumento dos níveis de glicose sanguínea em animais experimentais, como observado em diversos trabalhos (17; 18; 19; 20). Conseqüentemente, há uma elevação do triacilglicerol, pois o excesso de glicose pode ser metabolizado no tecido adiposo.

Em relação ao colesterol, existem controvérsias sobre os efeitos do café. Alguns trabalhos demonstraram que a bebida café pode influenciar fatores de risco cardiovascular, incluindo colesterol (21; 22) e homocisteína séricos (23; 24). Entretanto, outros trabalhos não encontraram esta relação (25; 26; 27). Adicionalmente, o café contém substâncias antioxidantes que diminuem a oxidação do LDL, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico, minimizando distúrbios cardiovasculares (28).

Apesar deste trabalho não ter utilizado o preparo convencional da bebida café, pois o objetivo foi avaliar diversas partes da planta (*Coffea arabica* L.) no diabetes, para o uso em fitoterapia e não a bebida propriamente dita. Os resultados indicam que substâncias presentes no café podem ser úteis na prevenção e tratamento do diabetes e são coerentes com vários trabalhos que analisaram a associação do café com esta patologia. Estudo realizado na Finlândia (29), envolvendo mais de 14.000 pessoas, relata que o alto consumo de café pode reduzir o risco de DM2. Como a Finlândia tem o índice mais alto de consumo de café do mundo, foi possível determinar o risco de diabetes com altos níveis de consumo. Neste trabalho, pessoas que bebiam grandes quantidades de café, dez ou mais xícaras por dia, apresentaram menores probabilidades de desenvolver o DM. Esse consumo reduziu o risco em 79% no caso das mulheres e em 55% no caso dos homens em desenvolver o DM2. A constatação também foi positiva para as pessoas que utilizavam quantidades moderadas, três a quatro xícaras por dia, para quem o risco de diabetes foi 29% menor nas mulheres, e 27% nos homens.

Em um estudo de *coorte* holandês foi observado que os participantes que consumiam 7 ou mais xícaras de café por dia apresentaram 0,50 (95% de intervalo de confiança) menos chance de desenvolver DM2, quando comparado com os que consumiam 2 ou menos xícaras da bebida por dia (6). Possivelmente, a redução dos níveis de glicose pode ser atribuída às substâncias presentes no café, como o ácido clorogênico (ACL), trigonelina, cafeína, lignina e

minerais (7). Entretanto, os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não estão claros.

Pesquisas indicam que a ingestão de ácido clorogênico (ACL) reduz a concentração de glicose em ratos (30; 31). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos do ACL no metabolismo da glicose (7). Estudos in vitro e com animais (31) utilizando o ACL mostraram que este composto pode inibir a produção hepática de glicose por inibir a glicose-6-fosfatase. O ACL também pode diminuir a absorção da glicose no intestino por inibir a glicose-6-fosfato translocase 1 e reduzir o gradiente de sódio (32). Adicionalmente, o ACL parece estimular a secreção do hormônio incretina glucagon-like peptide 1 em humanos (32). As incretinas são hormônios secretados pelas células endócrinas localizadas no epitélio do intestino delgado. Existem dois hormônios principais: o GLP-1 (glucagon-like peptide-1) e o GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide). O GLP-1 é o mais importante na patogenia do DM2, ele estimula a síntese e a secreção de insulina dependente da glicemia; inibe a secreção de glucagon, promove o retardamento do esvaziamento gástrico e diminui o apetite. A ingestão de cafeína foi associada com a redução da sensibilidade à insulina em humanos (33; 34; 35). Este efeito ocorre, provavelmente, pelo fato da cafeína aumentar a síntese de epinefrina (35). A epinefrina, além da sua função como neurotransmissor, também pode influenciar a taxa metabólica, estimulando a secreção de insulina, a glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos (36). Porém, os estímulos da cafeína no aumento dos níveis de epinefrina diminuem após ingestão contínua (37).

Baseados em estudos com animais, os efeitos da cafeína no metabolismo da glicose através do aumento da expressão de proteínas não acopladas e da oxidação lipídica também podem ser sugeridos (12). Entretanto, recentes descobertas de estudos observacionais indicam que a associação inversa do consumo de café e o risco de DM2 podem não ser explicados pela cafeína, pois o consumo de café descafeinado também foi associado ao menor risco de DM2 (38; 39). Além disso, a ingestão de cafeína, em estudos de intervenção por períodos curtos, mostrou aumentar a concentração de glicose pós prandial (40; 41; 42; 37).

As ligninas presentes no café podem afetar o metabolismo de glicose através de sua ação antioxidante. Elas podem ser convertidas a enterolactona ou enterodiol por bactérias intestinais e entrar na circulação sanguínea (34). O café também contém numerosos outros compostos, incluindo quantidades substanciais de Mg, K, trigonelina e niacina (43). MISHKINSKY *et al.* (15) mostraram que a trigonelina reduziu a concentração de glicose em ratos diabéticos.

A alta ingestão de Mg também foi associada ao menor risco de DM2 em vários estudos (44), e doses farmacológicas foram associadas a uma melhor sensibilidade à insulina em outros estudos de intervenção. O magnésio é co-fator de várias enzimas envolvidas nos processos de fosforilação, que são essenciais para o metabolismo da glicose (44). Entretanto, a ingestão regular de Mg não explicou a associação do consumo de café com a tolerância à glicose e menor risco de DM2 (38; 45).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que todos os tratamentos in vivo com tinturas da planta café, da casca cereja, fruto verde e fruto cereja, reduziram significativamente, em diferentes proporções, os parâmetros de glicose e triacilglicerol em ratos diabéticos induzi-

dos por aloxano. Estes dados sustentam a hipótese que o café está associado a um menor risco de DM2.

A maioria dos tratamentos promoveu pequeno aumento nos níveis de colesterol, no entanto, do ponto de vista clínico, estes não foram capazes de causar hipercolesterolemia. Os benefícios das tinturas de café utilizadas neste trabalho nos níveis de glicose e triacilglicerol se sobrepõem ao possível efeito negativo sobre o parâmetro colesterol, indicando que estas tinturas podem ser promissoras para o tratamento da diabetes. Todos os trabalhos que analisaram o efeito do café no diabetes investigaram a bebida e não a planta como ocorreu neste trabalho. Muitas substâncias são formadas e degradadas durante o processo de torrefação do café e que não estão presentes no café *in natura*. Portanto, é interessante que seja analisado a composição química destas tinturas, para facilitar a compreensão dos mecanismos das substâncias presentes no café no metabolismo da glicose. Sugere-se, após estudos de toxicidade em animais, que estas tinturas sejam avaliadas em humanos, visando o aumento de opções terapêuticas e a redução dos custos com medicamentos para tratamento do diabetes.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia/Fapemig e CNPq.

REFERÊNCIAS

- 1- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus. In: Textbook of medical physiology. Elsevier Science, 78 (10): 884-897, 2000.
- 2- SACKS, D.B.; BRUNS, D.E.; GOLDSTEIN, D.E.; MACLAREN, N.K.; MCDONALD, J.M. & PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes mellitus. Clin Chem, 48: 436-472, 2002.
- 3- ORTIZ, M.C.A. & ZANETTI, M.L. Diabetes mellitus: fatores de risco em uma instituição de ensino da área da saúde. Rev.latino-am.enfermagem, 8(6): 128-132, 2000.
- 4- KING, H.; AUBERT, R.E. & HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimate, and projections. Diabetes care, 21: 1414-31, 1998.
- 5- AMOS, A.F.; MCCARTY, D.J. & ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. Diabet Med, 14: 7-85, 1997.
- 6- VAN DAM, R.M. & FESKENS, E.J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. Lancet, 360: 1477-1488, 2002.
- 7- VAN DAM, R.M. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 16: 69-77, 2006.
- 8- VAN DAM, R.M. & HU, F.B. Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes. JAMA, 294(1):63-88, 2005.
- 9- CLARKE, R. J. & MACRAE, R. Coffee chemistry. Elsevier Applied Science, 1: 12-29, 1985.
- 10- DAGLIA, M.; PAPETI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÉ, F. & GAZZANI, G. In vitro antioxidant and in vivo protective activities of green and roasted coffee. J. Agric. Food Chem., 48: 1449-1454, 2000.
- 11- BORRELLI, R.C.; VISCONTI, A.; MENNELA, M.A. & FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. J. Agric. Food Chem., 50: 6527-6533, 2002.
- 12- YOSHIOKA, K.; KOGURE, A.; YOSHIDA, T. & YOSHIKAWA, T. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. Lancet, 360: 703, 2002.
- 13- SHEARER, J.; FARAH, A.; DE PAULIS, T.; BRACY, D.P.; PENCEK, R.R. & GRAHAM, T.E. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. J Nutr, 133: 3529-3532, 2003.
- 14- DE VALK, H.W. Magnesium in diabetes mellitus. Neth J Med., 54(4): 139-146, 1999.

- 15- MISHKINSKY, J.; JOSEPH, B. & SULMAN, F.G. Hypoglycaemic effect of trigonelline. Lancet, 16: 1311-1312, 1967.
- 16- MAIER, H.G. The acids of coffe. Proc 12th Asic Coll, 229-237, 1987.
- 17- CAVALLI, V.L.L.O.; SORDI, C.; TONINI, K.; MUNERON, T.; GUIGI, A. & JÚNIOR, W.A.R. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. Rev. bras. farmacogn., 17(1): 17-24, 2007.
- 18- LERCO, M.M.; SPADELLA, C.D.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, A.S. & PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta Cir Brás., 18: 132-142, 2003.
- 19- MAZZANTI, C.M.; SCHOSSLER, D.R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRION, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. & CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. Ciência Rural, 33(6): 1061-1065, 2003.
- 20- OLIVEIRA, T.T.; LIBERATO S.C.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; MAGALHÃES, N.M.; LIMA, E.Q., BRUNORO, N.M.C.; BRESSAN, J.; COSTA, M.R.; SILVA, R. R. & LEÃO, M.A. Efeito de naringenina e fruta-de-lobo no diabetes. Rev. bras. anal. Clin, 34(3): 161-165, 2002.
- 21- THELLE, D.S. Coffee, tea and coronary heart disease. Curr Opin Lipidol. Feb., 6(1): 25-27, 1995.
- 22- URGERT, R. & KATAN, M.B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. Annu Rev Nutr , 17: 305-324, 1997.
- 23- EL-KHAIRY, L.; UELAND, P.M.; NYGARD, O.; REFSUM, H. & VOLLSET, S.E. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. Am J Clin Nutr; 70: 1016-24, 1990.
- 24- DE BREE, A.; VERSCHUREN, W.M.; KROMHOUT, D.; KLUIJTMANS, L.A. & BLOM, H.J. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. Pharmacol Rev; 54: 599-618, 2002.
- 25- BEYNEN, A.C. Boiled coffee fails to raise cholesterol in hamsters and rats. Br. J. Nutr., 76: 755-764, 1996.
- 26- MENNEN, L.I.; DE COURCY, G.P.; GUILLAND, J.C.; DUCROS, V.; BERTRAIS, S.; NICOLAS, J.P.; MAUREL, M.; ZAREBSKA, M.; FAVIER, A.; FRANCHISSEUR, C.; HERCBERG, S. & GALAN, P. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. Am. J. Clin. Nutr., 76: 1279 - 1289, 2002.
- 27- GREENLAND, S. A meta-analysis of coffee, myocardial infarction, and coronary death. Epidemiology, 4: 366-374, 1993.
- 28- DE ROOS, B.; CASLAKE, M.J.; STALENHOF, A.F.H.; BEDFORD, D.; DEMACKER, P.N.M. & KATAN, M.B. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in healthy normolipidemic subjects. Am. J. Clin. Nutr., 73:45-52, 2001.
- 29- TUOMILEHTO, J.; HU, G.; BIDELE, S.; LINDSTROM, J.; JOUSILAHTI, P. Coffee consumption and risk of Type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. JAMA, 291: 1213-1219, 2004.
- 30- ANDRADE-CETTO, A. & WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol, 78: 145-149, 2001.
- 31- HERLING, A.W.; BURGER, H.; SCHUBERT, G.; HEMMERLE, H.; SCHAEFER, H. & KRAMER, W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose- 6-phosphatase in rats. Eur J Pharmacol, 386: 75-82, 1999.
- 32- JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N. & MORGAN, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. Am J Clin Nutr, 78: 728-733, 2003.
- 33- GREER, F.; HUDSON, R.; ROSS, R. & GRAHAM, T. Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. Diabetes, 50: 2349-2354, 2001.
- 34- BHATHENA, S.J. & VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr, 76: 1191-1201, 2002.

- 35- KEIJZERS, G.B.; DE GALAN, B.E.; TACK, C.J. & SMITS, P. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*, 25: 364-369, 2002.
- 36- GRAHAM, T.E.; HIBBERT, E. & SATHASIVAM, P. Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. *J Appl Physiol*, 85: 883-889, 1998.
- 37- ROBINSON, L.E.; SAVANI, S.; BATTRAM, D.S.; MCLAREN, D.H.; SATHASIVAM, P. & GRAHAM, T.E. Caffeine ingestion before an oral glucose tolerance test impairs blood glucose management in men with type 2 diabetes. *J Nutr*, 134: 2528-2533, 2004.
- 38- SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A.; MANSON, J.E.; LEITZMANN, M.F. & STAMPFER, M.J. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 140: 01-08, 2004.
- 39- GREENBERG, J.A.; AXEN, K.V.; SCHNOLL, R. & BOOZER, C.N. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. *Int J Obes*, 29: 1121-1129, 2005.
- 40- WACHMAN, A.; RS HATTNER, R.S.; B GEORGE, B. & BERNSTEIN, D.S. Effects of decaffeinated and nondecaffeinated coffee ingestion on blood glucose and plasma radioimmunoreactive insulin responses to rapid intravenous infusion of glucose in normal man. *Metabolism*, 19(7): 539-546, 1970.
- 41- PIZZIOLO, A.; TIKHONOFF, V.; PALEARI, C.D.; RUSSO, E.; MAZZA, A.; GINOCCHIO, G.; ONESTO, C.; PAVAN, L.; CASIGLIA, E. & PESSINA, A.C. Effects of caffeine on glucose tolerance: A placebo-controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(11): 846-849, 1998.
- 42- LANE, J.D.; PIEPER, C.F.; PHILLIPS-BUTE, B.G.; BRYANT, J.E. & KUHN, C.M. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosom Med*, 64: 595-603, 2002.
- 43- MILDER, I.E.; ARTS, I.C.; VAN DE PUTTE, B.; VENEMA, D.P. & HOLLMAN, P.C. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr*, 93: 393-402, 2005.
- 44- LOPEZ-RIDAURA, R.; WILLETT, W.C.; RIMM, E.B.; LIU, S.; STAMPFER, M.J. & MANSON, J.E. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care*, 27: 134-140, 2004.
- 45- VAN DAM, R.M.; PASMAN, W.J. & VERHOEF, P. Effects of Coffee Consumption on Fasting Blood Glucose and Insulin Concentrations: randomized controlled trials in healthy volunteers. *Diabetes Care*, 27: 2990-2992, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Ricardo Antônio Zatti
Av. PH Rolfs - Vila Granetti
CEP. 36570 - Viçosa - MG

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

Navegue pelo portal **SBAC E-Learning**

www.sbac.org.br/ead



 **SBAC**
eLEARNING

A mais perfeita tradução de proximidade!

Perfil sorológico dos marcadores de Hepatite B em profissionais acadêmicos da área da saúde*

Serologic profile of Hepatitis B markers in professionals academics of the area of the health

Mirna Giselle Moreira¹, Patrícia de Fátima Evangelista¹ & Letícia Antunes Athayde²

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de marcadores sorológicos para hepatite B em profissionais acadêmicos da área da saúde, assim como a situação vacinal destes acadêmicos. Participaram da pesquisa 50 profissionais acadêmicos da área da saúde. As amostras foram identificadas e estocadas até a realização dos testes. Realizou-se, através do ensaio imunoenzimático, a detecção dos seguintes marcadores: HBsAg, anti-HBc e anti-HBs. Os dados analisados mostraram que 28% foram reagentes para o HBsAg e 72% não reagentes. Quanto ao anti-HBc, 98% foram não reagentes e 2% mostraram reagentes. Em relação ao anti-HBs, 48% mostraram positividade, enquanto 52% foram não reagentes. Observou-se que a grande maioria dos acadêmicos foi vacinada (80%), e 20% nunca receberam a vacina. A imunogênese anti-HBs (+) completou-se em 57,5% dos vacinados, entretanto 42,5% dos participantes que foram vacinados apresentaram anti-HBs (-). Baseados nestes resultados, conclui-se que a campanha de vacinação e implantação de medidas profiláticas devem ser intensificadas, bem como a realização de triagem sorológica para hepatite B dos profissionais da área da saúde para confirmação da imunização, visando à prevenção e controle da infecção pelo HBV nestes profissionais.

PALAVRAS-CHAVE - hepatite B; profissionais da saúde; sorologia; vacina anti-HBV

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the presence of serologic markers for hepatitis B in professionals academics of the area of the health, as well as vaccination of these academic ones. Participated in this study 50 professionals academics of the area of the health. The samples were identified and thrusted to the accomplishment of the tests. The following markers were detected by immunoenzymatic assay: HBsAg, anti-HBc and anti-HBs. Analyzed material showed that 28% were HBsAg positive and 72% negative. As to the anti-HBc, 98% were negative and 2% were positive. In relation to the anti-HBs, 48% were shown positively, while 52% were negative. It was observed that the academics' great majority was vaccinated (80%) and 20% never received the vaccine. The immunization anti-HBs (+) was completed in 57,5% of those vaccinated, however 42,5% participants that were vaccinated presented anti-HBs (-). Based on these results, concluded that vaccination campaigns and implantation of prophylactic measures should be intensified, as well as the accomplishment of serologic screen for hepatitis B the area of the health for confirmation of immunization seeking to the prevention and control of the infection for HBV in these professionals.

KEYWORDS - hepatitis B; health professionals; serology; anti-HBV vaccine

INTRODUÇÃO

A Hepatite viral do tipo B (HBV) constitui em um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, sendo que a sua maior incidência e prevalência está na África, Ásia e Pacífico Sul¹³. No Brasil, sob o ponto de vista epidemiológico, os estudos são escassos, sendo estes restringidos a grupos populacionais distintos, como no Espírito Santo e Oeste de Santa Catarina onde se observa uma alta taxa endêmica¹⁹. Na região Amazônica, o índice também é bem expressivo sendo que aproximadamente 5 a 15% dos habitantes da região são portadores da fase crônica da patologia, apresentando a expressão do antígeno de superfície (HBsAg) denominado como antígeno Austrália¹⁰.

A hepatite B é tida como uma doença ocupacional, que está intimamente relacionada com o grau de exposição destes profissionais em seus locais de trabalho, através de sua íntima relação com a manipulação de sangue e outros fluidos corporais de pacientes infectados pelo vírus¹⁰. Segundo dados estima-se que o risco de contaminação com o vírus do HBV é de 6 a 30% após acidente com agulha ou materiais perfurocortantes².

O primeiro registro de risco de transmissão da hepatite do tipo ocupacional na área da saúde data de 1949, quando Leibowitz, relatou um caso de hepatite em um profissional de um banco de sangue, comprovada posteriormente por outros autores o risco associado à manipulação dos fluidos e seus derivados¹⁰.

Atualmente já se sabe que a transmissão do HBV se dá pela: transfusão de sangue e seus derivados, relações

sexuais, exposição pariental às agulhas e outros instrumentos contaminados, usuários de drogas intravenosas no compartilhamento de seringas, transmissão vertical, contatos domiciliares, procedimentos odontológico-cirúrgico, por não adotarem regras de biossegurança, por soluções de continuidade de pele e mucosas, procedimentos de tatuagens sem o uso adequado de materiais descartáveis¹¹.

O vírus circula no sangue em altas concentrações e em baixos níveis em outros fluidos corporais. Sabe-se que é 100 (cem) vezes mais infectantes que o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), e 10 (dez) vezes mais do que o vírus da hepatite C (HCV)¹¹, e que sobrevive fora do organismo humano por até 1 semana, no plasma de 1 a 3 dias e nos hepatócitos por aproximadamente de 10 a 100 dias. Portanto possui uma infectividade elevada podendo infectar o homem com uma só partícula viral¹³.

O HBV pertence à família *hepadnaviridae*, tem como hospedeiro natural o homem e possui um tropismo por células hepáticas. A fase aguda é caracterizada histologicamente por degeneração dos linfócitos, com necrose focal, infiltração de parênquima e tratos portais com linfócitos, e a fase crônica pode permanecer por toda a vida podendo evoluir para uma cirrose e até um carcinoma hepatocelular, sendo estes portadores o principal reservatório do vírus²⁰. Considerando que muitos indivíduos infectados são assintomáticos ou que o número de casos não são devidamente notificados, o número real de contaminados ainda é subestimado¹¹.

O diagnóstico laboratorial é feito através da detecção de marcadores sorológicos que podem ser realizados através de testes de pesquisas, no soro, do antígeno de superfície

Recebido em 28/09/2009

Aprovado em 29/07/2010

*Faculdade de Saúde Ibituruna – FASI, Laboratório de Análises Clínicas

¹Biomédicas. Acadêmicas do curso de Biomedicina da FASI

²Biomédica. Mestre em Biociências aplicadas a Farmácia/FCFRP-USP. Docente do curso de Biomedicina da FASI.

do vírus da Hepatite B (HBsAg) e seu respectivo anticorpo (anti-HBs), além de anticorpos totais específicos para antígeno do nucleocapsídeo desse vírus (anti-HBc), através do método de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Nas últimas décadas tem se observado um grande avanço nas tecnologias empregadas nos exames e no diagnóstico. Atualmente a melhor profilaxia no combate a infecção pela hepatite B é por meio da vacina que foi desenvolvida a partir do plasma de doadores e só foi liberada para ser comercializada em 1982¹⁹.

É preconizado no Brasil que a vacinação seja feita em 3 (três) doses, no esquema de 0, 30 e 180 dias¹⁸. A via de administração é a via intramuscular, nas regiões do deltóide ou vasto lateral da coxa em crianças sendo a dosagem conforme a idade do receptor⁹. Se a série for interrompida após a primeira dose, a segunda deverá ser administrada logo em seguida, e a terceira pelo menos 2 (dois) meses, já no caso da falta da terceira dose deverá esta ser administrada imediatamente. A proteção se dá pela memória imunológica estabelecida¹².

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de marcadores sorológicos para Hepatite B em profissionais acadêmicos da área da saúde, assim como a situação vacinal destes acadêmicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Após aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética da Unimontes, foram obtidas amostras de soro de 50 pessoas, estudantes e profissionais da área da saúde da Faculdade de Saúde Ibituruna em Montes Claros-MG (Brasil). Os participantes foram abordados individualmente na faculdade e encaminhados ao laboratório de Análises Clínicas para a aplicação do questionário e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido sobre os objetivos do presente trabalho, bem como a coleta de amostra sanguínea para obtenção de soro. Todos os procedimentos foram realizados de maneira voluntária aos que se dispuseram a participar do estudo. Através de punção venosa, foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada indivíduo, e o soro obtido por centrifugação foi separado em eppendorf, identificado e estocado à temperatura de - 20 °C, até a realização dos testes sorológicos.

Coleta de informações

Foram obtidas, por meio de entrevista, utilizando-se questionário padronizado, informações contendo idade, sexo, uso de EPIs (equipamentos de proteção individual), ocorrência de acidentes de trabalho, histórico de transfusão sanguínea, presença de tatuagem, acupuntura, antecedentes a tratamento dentário, relato intrafamiliar de hepatite, vacina contra Hepatite B (1ª, 2ª e 3ª doses), compartilhamento de objetos cortantes de higiene pessoal e se como profissionais da área da saúde, sabem quais são as vacinas que devem ser tomadas.

Testes Sorológicos

Todas as amostras de soro foram analisadas para a pesquisa dos seguintes marcadores: antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) e seu respectivo anticorpo (anti-HBs), além de anticorpos totais específicos para antígeno do nucleocapsídeo desse vírus (anti-HBc), através do método de ensaio imunoenzimático (ELISA). A pesquisa de HBsAg, anti-HBc total e Anti-HBs foi realizada no laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Saúde Ibituruna – FASI, utilizando reativo comercial (Wiener lab e Symbiosys) e seguindo metodologia e análise recomendadas pelos fabricantes.

RESULTADOS

Características dos profissionais acadêmicos estudados

Em relação aos profissionais analisados, a média de idade desta população foi de 25,3, com idades limites entre 21 e 45 anos, sendo composta em sua maioria do sexo feminino (78%). Dos 50 profissionais analisados, 45 (90%) afirmaram o uso de equipamentos de proteção individual, 8 (16%) relataram ocorrência de acidente de trabalho seja por exposição ou por perfuro cortantes, 4 (8%) afirmaram já ter submetido a transfusão sanguínea, 9 (18%) apresentam tatuagem, todos (100%) nunca se submeterem à Acupuntura, 40 (80%) afirmaram possuir antecedentes ao tratamento dentário, e 14 (28%) afirmaram o compartilhamento de objetos cortantes. Quanto às características relacionadas à hepatite, 10 (20%) afirmaram a ocorrência intrafamiliar de hepatite, 4 (8%) confirmaram ser vacinados não relatando quantas doses foram administradas, 8 (16%) afirmaram ter tomado a 1ª dose, 10 (20%) à 2ª dose, 18 (36%) o ciclo completo com as 3 doses administradas e 10 (20%) relataram não serem vacinados. Em relação ao tempo decorrido após aplicação da 1ª dose, 39 (98%) afirmaram ter mais de 1 mês. Sobre o conhecimento das vacinas necessárias ao profissional da saúde, 30 (60%) demonstraram desconhecimento sobre quais vacinas são essenciais para os profissionais da área da saúde (Tabela 1).

TABELA I
Características dos 50 acadêmicos estudados.

Características	n	%
<i>Idade (anos)</i>		
Média	25,3	
Variação	21-45	
<i>Sexo</i>		
Feminino	39	78,0
Masculino	11	22,0
<i>Uso de EPIs</i>		
Sim	45	90,0
Não	5	10,0
<i>Ocorrência de acidente de trabalho</i>		
Sim	8	16,0
Não	42	84,0
<i>História de transfusão sanguínea</i>		
Sim	4	8,0
Não	46	92,0
<i>Presença de tatuagem</i>		
Sim	9	18,0
Não	41	82,0
<i>Acupuntura</i>		
Sim	0	0,0
Não	50	100,0
<i>Antecedente de tratamento dentário</i>		
Sim	40	80,0
Não	10	20,0
<i>Relato intrafamiliar de hepatite</i>		
Sim	10	20,0
Não	40	80,0
<i>Compartilhamento de objetos cortantes</i>		
Sim	14	28,0
Não	36	72,0
<i>Vacina anti-HBV</i>		
Sim	4	8,0
Sim (1 dose)	8	16,0
Sim (2 doses)	10	20,0
Sim (3 doses)	18	36,0
Não	10	20,0
<i>Tempo decorrido após a última dose</i>		
< 1 mês	1	2,0
> 1 mês	39	98,0
<i>Conhecimento das vacinas a serem tomadas por profissionais da saúde</i>		
Sim	20	40,0
Não	30	60,0

Determinação dos marcadores virais HBsAg, Anti-HBc total e Anti-HBs

A tabela 2 mostra que 14 (28%) dos profissionais acadêmicos foram reagentes para HBsAg. Quanto ao anti-HBc total (considerado marcador de exposição prévia ao HBV), 49 (98%) foram não reagentes e 1 (2%) mostrou-se reagente. Em relação ao anti-HBs, 24 (48%) foram reagentes, enquanto 26 (52%) apresentaram-se não reagentes, mostrando-se susceptíveis à infecção pelo HBV.

TABELA II
Resultados obtidos na determinação dos marcadores virais HBsAg, Anti-HBc total e Anti-HBs

Marcadores	Reagente		Não-reagente	
	n	%	n	%
HBsAg	14	28,0	36	72,0
Anti-HBc total	1	2,0	49	98,0
Anti-HBs	24	48,0	26	52,0

Relação entre a determinação do Anti-HBs e a imunização anti-HBV

Neste estudo, observou-se que a grande maioria dos acadêmicos foi vacinada (40-80%), e apenas 10 (20%) nunca receberam a vacina. A imunogênese (anti-HBs+) completou-se em 23 (57,5%) dos vacinados, entretanto 17 (42,5%) acadêmicos que foram vacinados apresentaram anti-HBs- (Tabela 3).

TABELA III
Relação entre valores obtidos na determinação do Anti-HBs e a imunização anti-HBV

Imunização	Anti-HBs +		Anti-HBs -		Total	
	n	%	n	%	n	%
Vacinados	23	57,5	17	42,5	40	100,0
Não-vacinados	1	10,0	9	90,0	10	100,0

DISCUSSÃO

A incidência da infecção pelo HBV em profissionais da saúde tem diminuído substancialmente desde a década de 80. Essa queda é atribuída à implementação dos procedimentos de biossegurança e, principalmente, ao aumento da cobertura vacinal nessa população¹⁸.

Em nosso estudo foram envolvidos profissionais acadêmicos do curso de Biomedicina e Farmácia atuantes no setor de análises clínicas, constituindo um grupo de risco para infecções que se transmitem a partir do sangue por via percutânea ou mucosa e susceptíveis a acidentes com perfurocortantes e a exposição a sangue e seus derivados, sendo que neste, o vírus circula em altas concentrações, e em baixos níveis como em outros fluidos corporais, incluído saliva. Sabe-se que o HBV é 100 (cem) vezes mais infectante que o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e 10 (dez) vezes mais que o vírus da hepatite C (HCV)¹¹. Portanto, estes profissionais manipulam estas amostras de maneira bem mais direta, mostrando a relevância deste estudo.

Os dados analisados mostraram que 14 (28%) foram reagentes para o HBsAg e 36 (72%) não reagentes. Quanto ao anti-HBc (considerado marcador de exposição prévia ao HBV), 49 (98%) foram não reagentes e 1 (2%) mostrou-se reagente. Em relação ao anti-HBs, 24 (48%) mostraram-se positividade, enquanto 26 (52%) foram não reagentes. Em um estudo realizado em profissionais de laboratório em Goiânia, Silva e colaboradores (2005)²³ observaram que 0,7% dos profissionais foram reagentes tanto para HBsAg quanto para Anti-HBc total, 2% foram reagentes somente para Anti-HBc total e 21,4% foram reagentes tanto para

Anti-HBc total quanto para Anti-HBs. Moreira e colaboradores (2007)¹⁸ observaram, em estudo realizado com profissionais de um laboratório de saúde pública, que 0,5% eram reagentes para o HBsAg, 10,4% para o anti-HBs e 89,1% não-reagentes para os dois marcadores. Carneiro e Daher (2003)³ observaram que 72,2% dos anestesiológicos analisados foram reagentes para o anti-HBs, 90% foram não reagentes para o anti-HBc e nenhum dos participantes do estudo mostrou positividade para o HBsAg. Em um outro estudo realizado em profissionais de hemodiálise de Goiânia, Lopes e colaboradores (2001)¹⁶ observaram que o anti-HBc foi observado isoladamente em 3,3% ou concomitantemente com os marcadores HBsAg e anti-HBs em 0,7% e 20,4% dos profissionais, respectivamente, resultando numa prevalência global para hepatite B de 24,3%. Constatou-se ainda neste estudo que apenas 49,3% dos profissionais apresentavam positividade para o marcador anti-HBs devido à vacinação prévia contra a hepatite B. Por outro lado, 40 (26,3%) indivíduos eram susceptíveis à infecção pelo HBV.

O HBsAg é um importante marcador de fase aguda e crônica, sendo ainda um ótimo indicador de portadores assintomáticos com Hepatite B crônica. Das amostras analisadas 14 (28%) foram reativas para este marcador, sendo que 2 achados relataram não serem vacinados e não tiveram reatividade para o Anti-HBs. Este achado pode indicar um paciente assintomático que já sofreu exposição ao vírus, porém não manifestou a doença, pois existem estudos que afirmam que portadores de HBV podem ficar assintomáticos por mais 10 anos, sendo estes transmissores em potencial¹¹. Outra hipótese é considerar o achado como um falso positivo, pois a especificidade deste marcador com pacientes com sinais e sintomas de hepatopatia é alta, entretanto foi sugerido aos voluntários que procurasse realizar outros exames confirmatórios como (DNA-HBV) usado na biologia molecular, pois a identificação destes pacientes assintomáticos realizada precocemente reduz a transmissão continuada¹¹. É relevante ressaltar o número expressivo de achados com este marcador, sendo estes pertencentes a um grupo de risco, idade média de 25,3 anos, dentro de uma faixa sexualmente ativa, e com relatos de acidentes com materiais perfurocortantes ou exposição percutânea, fatores estes que potencializam o risco de transmissão deste vírus tornando o achado significativo.

Em relação ao Anti-HBc, sua presença no soro é indicativo de enfermidade ativa, podendo ser detectável por um longo tempo depois da infecção, podendo ainda ser indicador de infecção anterior. Das 50 amostras analisadas somente 1 apresentou-se reagente para este marcador que mostrou-se também reagente para o anti-HBs, no qual houve relato deste acadêmico de infecção intrafamiliar para Hepatite do tipo A, presença de tatuagem, compartilhamento de objetivos de higiene pessoal, demonstrando imunidade adquirida naturalmente após contato com o HBV.

Quanto ao Anti-HBs, este marcador detecta a presença de anticorpos contra HBsAg, sendo este um importante acompanhante dos pacientes infectados com HBV e para o controle da resposta imunológica depois da vacina. As vacinas contra a hepatite B disponíveis no Brasil são produzidas por engenharia genética por meio da inserção de um plasmídeo contendo o antígeno de superfície do vírus B (HBsAg) em levedura. As vacinas não promovem infecção, pois não contêm DNA viral. A vacinação induz apenas à produção do anti-HBs. As vacinas podem conter ou não timerosal e o HBsAg é adsorvido ao hidróxido de alumínio⁴. Os esquemas mais utilizados freqüentemente são de três

doses nos momentos zero, um e seis meses após a primeira dose. O intervalo recomendado entre a primeira e a segunda dose é de um mês, e entre a segunda e terceira é de, no mínimo, dois meses. A terceira dose deve ser administrada após os seis meses de idade^{1,5}. Se a série foi interrompida após a primeira dose, a segunda deve ser dada logo que possível, e a terceira pelo menos 2 meses após a segunda. Se apenas a terceira dose estiver faltando, ela deve ser administrada imediatamente. Esquemas alternativos podem ser utilizados da seguinte forma: vacinação rápida: primeira dose no dia 0 e as outras doses após 1, 2, meses e reforço aos 12 meses; vacinação acelerada: primeira dose no dia 0 e as outras após 7 e 21 dias e reforço aos 12 meses; esquema de 2 doses: primeira dose no dia 0 e outra 6-12 meses após (indivíduos especiais)¹⁷.

Em relação à imunogenicidade e eficácia da vacina, os títulos de anti-HBs considerados protetores são superiores a 10 mUI/ml. Após três doses intramusculares de vacina contra hepatite B, mais de 90% dos adultos jovens e mais de 95% das crianças e adolescentes desenvolvem respostas adequadas de anticorpos. Porém, com a idade, ocorre queda da imunogenicidade e, aos 60 anos, aproximadamente, somente cerca de 75% dos vacinados desenvolvem anticorpos protetores⁵. Na faixa etária pediátrica, os níveis de proteção alcançados com a vacina são de 16 a 40% após uma única dose, 80 a 95% depois de duas doses e 98 a 100%, seguindo três doses^{8,22}. Entre os adolescentes e os adultos, as taxas de resposta de anticorpos são de 20 a 30% após uma dose, 75 a 80% seguindo duas doses e 90 a 95% depois de três doses. A garantia da eficácia em longo prazo da vacina é devida à resposta anamnésica anti-HBs^{6,8,21}.

Os fatores que podem afetar a resposta à vacina incluem: modo de conservação da vacina, local da aplicação, sexo, idade, peso maior que 70 kg, obesidade, fumo, fatores genéticos, doenças crônicas e condição nutricional e imunológica. Devido à excelente imunogenicidade da vacina, não está indicada sorologia após a vacinação, exceto para os grupos de risco, tais como: profissionais da saúde, pacientes em diálise e recém-nascidos de mães portadoras do HBsAg. Nesse caso, o teste sorológico deve ser realizado um a três meses após completar o esquema vacinal⁵. Os níveis de anticorpos derivados da vacina normalmente declinam com o passar do tempo, mas eles permanecem por pelo menos 15 anos após a série completa de vacinação e são reativados, quando necessário, pela memória imunológica. Por esse motivo, doses de reforço não são habitualmente recomendadas, a não ser em alguns grupos especiais, de risco^{6,7}. A vacina tem eficácia de 80% a 100% em prevenir a infecção ou a doença clínica naqueles que recebem o esquema completo^{5,24}. Em Taiwan, país de alta endemicidade da hepatite B, oito anos após o início da imunização universal, houve redução de cinco vezes na porcentagem de crianças HBsAg positivas. A eficácia protetora da vacina foi de 85%⁵. Houve diminuição significativa nos índices de mortalidade por hepatocarcinoma em crianças no mesmo país entre 1984 (época do início da vacinação) e 1993¹⁵. No Alaska, região de alta endemicidade de hepatite B, dez anos após a implantação da imunização universal dos lactentes, entre 271 crianças menores de dez anos imunizadas, nenhuma ficou portadora crônica, e apenas quatro mostravam evidência de infecção progressa resolvida, sugerindo que a vacinação universal pode levar à eliminação de novos casos de infecção crônica¹⁴.

Neste estudo, observou-se que a grande maioria dos acadêmicos foi vacinada 40 (80%), e 10 (20%) nunca receberam a vacina mostrando que estes acadêmicos eram sus-

ceptíveis à infecção pelo HBV. A imunogênese (anti-HBs+) completou-se em 23 (57,5%) dos vacinados, entretanto 17 (42,5%), participantes que foram vacinados apresentaram anti-HBs-. Sendo que 8 receberam a 1ª dose há mais de 1 mês, e dentre estes, 3 apresentaram positividade para o Anti-HBs corroborando com estudos que demonstraram que, em adultos, a resposta de anticorpos após a 1ª dose é de 20 a 30%^{6,8,21}. Em relação à vacinação das 2ª doses, 10 afirmaram terem tomado há mais de 1 mês, e dentre estes 5 tiveram reatividade para Anti-HBs corroborando também com estudos que demonstraram que a porcentagem, em adultos, das taxas de produção de anticorpos após a administração da 2ª dose é de 75 a 80%^{6,8,21}, fato que está intimamente relacionado com a memória imunológica de cada indivíduo, sendo concluído que 50% dos que afirmaram terem tomado somente as duas doses se encontram imunizados. Quanto ao esquema de vacinação completo, 18 afirmaram ter recebido as três doses, sendo que 14 deles apresentaram positividade para o Anti-HBs e 4 profissionais não completaram a imunogênese para Anti-HBs. Segundo Ferreira e Silveira (2006)¹², a taxa de produção de anticorpos após o esquema de vacinação completo é de 90 a 95%, demonstrando que mesmo após a vacinação completa existe uma pequena porcentagem de indivíduos que podem não ficar imunes, comprovando a importância da realização de testes sorológicos preconizado pelo Ministério da Saúde em profissionais da área da saúde após esquema de vacinação completo, para confirmação da imunização, uma vez que estes profissionais estão susceptíveis a infecções pelo HBV através de sua íntima relação com a manipulação de sangue e outros fluidos corporais de pacientes infectados pelo vírus⁹.

CONCLUSÃO

Não há dúvida que a imunoprofilaxia é o método de menor custo-benefício para controlar globalmente a infecção pelo vírus B e suas complicações. Apesar da prevalência de vacinação para hepatite B entre os profissionais acadêmicos estudados ser alta, ainda não é satisfatória em decorrência da baixa positividade para o Anti-HBs nesses indivíduos. A falta de informação, possivelmente relacionada à menor reciclagem profissional, parece ser um dos principais fatores limitantes da vacinação, e sugere a importância de iniciativas desta natureza, uma vez que o Ministério da Saúde disponibiliza gratuitamente as doses da vacina para os profissionais da área da saúde.

Portanto, existe relutância quanto à proteção contra o HBV, pois muitos acadêmicos são susceptíveis à infecção por esse vírus ou por não serem vacinados, ou por não terem completado o esquema da vacinação, ou por não apresentarem resposta imune à vacina, concluindo que campanhas de vacinação e implantação de medidas profiláticas devem ser intensificadas, bem como a realização de triagem sorológica para hepatite B dos profissionais da área da saúde para confirmação da imunização, visando a prevenção e controle da infecção pelo VHB nestes profissionais.

REFERÊNCIAS

- 1 - AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics, 2000.
- 2 - BREVIDELLI, M. M. & CIANCIARULLO, T. I. - Análise dos acidentes com agulhas em um hospital universitário: situações de ocorrência e tendências. Rev. Latino-Am. Enfermagem, 10(6), 2002.

- 3 - CARNEIRO, A. F. & DAHER, R. R. - Soroprevalência do vírus de hepatite B em anestesiolistas. Rev. Bras. Anesthesiol., 53(5), 2003.
- 4 - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION UPDATE. Expanded availability of thimerosal preservative: free hepatitis B vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 49: 642-51, 2000.
- 5 - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 7th ed. Atlanta, 2002.
- 6 - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Hepatitis surveillance report no. 59. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2004.
- 7 - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. - Hepatitis B. In: Atkinson, W.; Hamborsky, J.; Wolfe, C. - Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 8th ed. Washington: Public Health Foundation, 2004, 191-212.
- 8 - DAVIS, J. P. - Experience with hepatitis A and B vaccines. Am. J. Med. 118 Suppl 10A:7S-15S, 2005.
- 9 - DIVISÃO DE IMUNIZAÇÃO. - Vacina contra hepatite B. Rev. Sau. Publ., 40(6), 2006.
- 10 - FERNANDES, J. V.; BRAZ, R. F. S.; NETO, F. V. A.; SILVA, M. A.; COSTA, N. F. & FERREIRA, A. M. - Prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em trabalhadores do serviço hospitalar. Rev. Sau. Publ., 33(2), 1999.
- 11 - FERREIRA, C. T. & SILVEIRA, T. R. - Viral Hepatitis: epidemiological and preventive aspects. Rev. bras. epidemiol., 7(4), 2004.
- 12 - FERREIRA, C. T. & SILVEIRA, T. R. - Prevenção das hepatites virais através de imunização. J. Pediatr. (Rio J.), 82(3), 2006.
- 13 - FONSECA, J. C. F. - História natural da hepatite crônica B. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 40(6), 2007.
- 14 - HARPAZ, R.; MCMAHON, B. J.; MARGOLIS, H. S.; SHAPIRO, C. N.; HAVRON, D. & CARPENTER G. - Elimination of new chronic hepatitis B virus infections: results of the Alaska immunization program. J. Infect. Dis. 181:413-8, 2000.
- 15 - LEE, C. L. & KO, Y. C. - Hepatitis B vaccination and hepatocellular carcinoma in Taiwan. Pediatrics. 99:351-3, 1997.
- 16 - LOPES, C. L.; Martins, R.M.B.; Teles, S.A.; Silva, S.A.; Maggi, P.S. & Yoshida, C.F.T. - Perfil soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B em profissionais das unidades de hemodiálise de Goiânia-Goiás, Brasil Central. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 34(6), 2001.
- 17 - MAST, E. E.; MARGOLIS, H. S.; FIORE, A. E.; BRINCK, E. W.; GOLDSTEIN, W.; WANG, S. A.; MOYER, L. A.; BELL, B.P. & ALTER, J.A. - A comprehensive immunization strategy eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Part 1: Immunization of infants, children, and adolescents. MMWR Recomm. Rep. 54:1-31, 2005.
- 18 - MOREIRA, R. C.; SARACENI, C.P.; OBA, I. T.; SPINA, A. M.M.; PINHO, J. R. R.; SOUZA, L.T. M.; OMOTO, T. M.; KITAMURA, C. & OSEKA, G. - Soroprevalência da hepatite B e avaliação da resposta imunológica à vacinação contra a hepatite B por via intramuscular e intradérmica em profissionais de um laboratório de saúde pública. J. Bras. Patol. Med. Lab., 43(5), 2007.
- 19 - NUNES, H. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; SOARES, M. C. P. - Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. Cad. Saúde Pública, 23(11), 2007.
- 20 - STITES, D.P.; TERR, A.I. & PARSLOW, T.G. - Imunologia médica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- 21 - POLAND, G. A. - Evaluating existing recommendations for hepatitis A and B vaccination. Am. J. Med. 118 Suppl 10A:16S-20S, 2005.
- 22 - SHETE, P. B. & DAUM, R. S. - Real versus theoretical: assessing the risks and benefits of postponing the hepatitis B vaccine birth dose. Pediatrics. 109:701-3, 2002.
- 23 - SILVA, P. A.; FIACCADORI, F. S.; BORGES, A.M.T.; SILVA, S. A.; DAHER, R.R.R. & MARTINS, R.M.B. - Seroprevalence of hepatitis B virus infection and seroconversion to anti-HBsAg in laboratory staff in Goiânia, Goiás. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 38(2), 2005.
- 24 - WONG, W. C. & TSANG, K. K. - A mass hepatitis B vaccination programme in Taiwan: its preparation, results and reasons for uncompleted vaccinations. Vaccine. 12:229-34, 1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Mirna Giselle Moreira
Rua Luiz Arruda Batista, 410
CEP. 39270-000 - Pirapora - MG



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Anticorpos anti-toxoplasma em gestantes atendidas em unidades de saúde do município de Ijuí/RS*

Anti-toxoplasma antibodies in pregnancies attending in health unit at Ijuí city/RS

Marilei Uecker Pletsch¹, Karla Renata de Oliveira² & Francine Toller Saraiva³

RESUMO - O diagnóstico da toxoplasmose durante a gestação é importante, pois a mãe pode transmitir ao feto esta doença o que pode resultar em abortamento, prematuridade, crescimento intrauterino retardado, malformações diversas, prenhez molar e óbito intra-útero. Este estudo tem como objetivo identificar a presença de anticorpos anti-toxoplasma em gestantes atendidas em Unidades de Saúde do município de Ijuí. A identificação dos anticorpos ocorreu através do teste de microhemaglutinação. Participaram deste estudo 80 gestantes no período de abril de 2005 a dezembro de 2006. A média de idade das gestantes que realizaram os exames foi de 25 anos e 59% não possuíam o ensino fundamental completo. Também, é relevante o desconhecimento das gestantes sobre os riscos relacionados à patologia em questão. Com relação à sorologia, nenhuma delas apresentou anticorpos IgM anti-toxoplasma e 54 (67%) apresentaram sorologia reagente para o anticorpo IgG anti-toxoplasma. Esses resultados são coerentes com outros estudos já realizados no Sul do Brasil. Desta forma, é importante manter as gestantes não reagentes (33%) sob monitoramento, para evitar uma contaminação primária destas e consequentemente danos ao feto.

PALAVRAS-CHAVE - toxoplasmose; gestantes; sorologia

SUMMARY - The diagnosis of toxoplasmosis is important during the pregnancy, therefore the mother can transmit this illness to the embryo and it can result in abortion, premature baby, intrauterine growth retardation, many malformations, molar pregnancy and intrauterine death. The objective of this study is to identify the presence of anti-toxoplasma antibodies in pregnancies attending in Health Unit at Ijuí city. The antibodies identification occurred through the micro haemagglutination test. The data collection was carried out in the period from April 2005 to December 2006 with 80 pregnancies. The pregnancies age media was 25 years old and 59% didn't have completed the basic education. Also is relevant the unknown of the pregnancies about the illness risks. About the serology, none of pregnancies have the IgM anti-toxoplasma antibodies and 54 (67%) had presented reacting serology to the IgG anti-toxoplasma antibodies. These results are coherent with other studies realized in the South of Brazil. It is important to keep the non reacting pregnancies (33%) on monitoring to prevent a primary contamination and, by consequence, the embryo damages.

KEYWORDS - toxoplasmosis; pregnancies; serology

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), um parasito intracelular de humanos e animais. Também é chamada de "doença do gato", já que este é o hospedeiro definitivo do parasito e principal transmissor da doença aos humanos. É uma infecção que apresenta manifestações variadas, incluindo desde quadros assintomáticos até quadros de manifestações sistêmicas extremamente graves (CAMARGO, 2001; VIEGAS *et al.* 2002^{1,12}). O parasita atinge o conceito por via transplacentária causando danos de diferentes graus de gravidade, dependendo da virulência da cepa do parasita, da capacidade da resposta imune da mãe e do período gestacional em que a mulher se encontra, podendo resultar, inclusive, em morte fetal ou em graves manifestações clínicas (SPALDING *et al.* 2003⁹). Hinrichsen *et al.* (2005), ressaltam que a toxoplasmose congênita resulta da infecção primária aguda da mãe no período gestacional. Os mesmos autores alertam que o risco de infecção fetal aumenta com a evolução da gestação.

A toxoplasmose é uma parasitose de distribuição mundial em que a soropositividade na população adulta pode variar de 20 a 90% (GALVÁN-RAMÍREZ *et al.* 1998²). Estudos realizados por diversos autores mostram que a presença de anticorpos anti-toxoplasma em gestantes pode variar muito de região para região. No Rio Grande do Sul apontam que a presença de anticorpos do parasito pode variar em cerca de 60% a 75% da população adulta (VARELLA *et al.* 2003; SPALDING *et al.* 2005^{11,10}). De acordo com Varella *et al.*

(2003) esta variação se deve também a características climáticas, fatores culturais e hábitos alimentares. Este estudo pretende conhecer a estimativa de gestantes atendidas em Unidades de Saúde do município de Ijuí/RS com soropositividade para toxoplasmose.

METODOLOGIA

Realizou-se coleta de soro e entrevista com as gestantes atendidas no serviço público de Saúde do município de Ijuí, no período de março de 2005 até dezembro de 2006. Antes da coleta, as gestantes foram esclarecidas do procedimento e concordaram com a coleta da amostra, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras de sangue foram coletadas junto ao Posto de coleta da Secretaria Municipal de Saúde de Ijuí, no momento em que a gestante realizava os exames de rotina do acompanhamento pré-natal. As amostras foram processadas no laboratório de Imunologia da UNIJUI. Para as análises, utilizou-se a técnica de Microhemaglutinação e as amostras positivas foram tituladas. Antes da utilização, as amostras de soro foram inativadas a 56° por 30 minutos e a seguir procedeu-se à triagem inicial de todas as amostras, com uma diluição inicial do soro de 1/16. As amostras reagentes nessa etapa inicial foram tituladas com a presença e ausência de 2-Mercaptoetanol. Todas as reações foram realizadas com a presença de controles positivo e negativo e a leitura realizada 90 minutos após a incubação. Após a realização dos ensaios, os resultados foram encaminhados para a Unidade de Saúde onde a gestante realiza o

Recebido em 23/04/2009

Aprovado em 24/08/2010

*Pesquisa desenvolvida com apoio da Vice-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão – Comitê de Extensão e Cultura

¹Farmacêutica; Mestre em Ciências Farmacêuticas; Professora Assistente do DCSa – UNIJUI. marileiu@unijui.edu.br; Rua do Comércio, 3000, Bairro Universitário – Ijuí/RS. EP98700-000

²Farmacêutica; Mestre em Bioquímica; Professora Assistente do DCSa – UNIJUI.

³Acadêmica do Curso de farmácia da UNIJUI; Bolsista PIBEX

acompanhamento pré-natal. A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIJUI, segundo Parecer Consubstanciado N° 46/2005.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período de estudo totalizou 21 meses, sendo que 80 gestantes constituíram a amostra desta pesquisa, das quais 67% (54) apresentaram resultados positivos para IgG na triagem inicial e 33% (26) sorologia não reagente, indicando que essas gestantes são imunes e suscetíveis a toxoplasmose respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos dos estudos realizados por Reis *et al.*, (2006), que encontraram 67,5% das gestantes com sorologia reagente para anticorpos IgG e por Leão (2001) que verificou em puérperas do município de Cuiabá a prevalência de anticorpos IgG para toxoplasmose de 70,7%. No procedimento de titulação e identificação, realizado neste estudo, nenhuma das gestantes apresentou resultado reagente para IgM, o que indica que nenhuma das gestantes estudadas encontra-se na fase aguda da doença. Os resultados da sorologia estão expressos na figura 1.

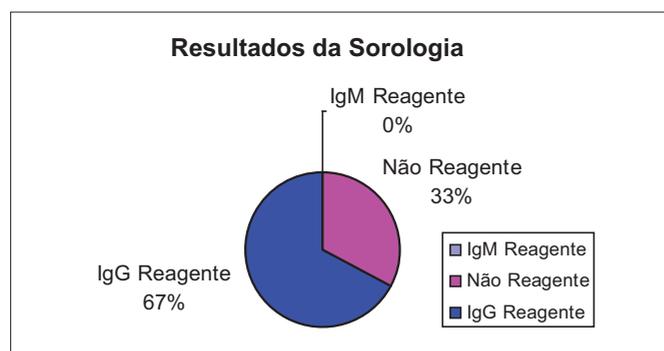


Figura 1: Triagem sorológica inicial das 80 gestantes participantes deste estudo.

Entretanto, nos estudos realizados por Kawasaki, Carvalho e Lucarevski, (2006), com uma população residente no interior de São Paulo e por Margonato *et al.*, (2007), no Paraná, foi verificado, respectivamente, que 1,3 e 2,5% das mulheres estudadas apresentavam resultado positivo para IgM.

A idade média das gestantes atendidas foi de 25 anos, sendo que a mais jovem apresentava 14 anos e a mais velha 50 anos no momento da coleta, o que está de acordo com Kawasaki, Carvalho e Lucarevski, (2006), que verificaram a idade média de 24 anos variando entre 13 e 47 anos. No mesmo estudo, os autores verificaram que 37,4% das gestantes eram múltiparas, enquanto nesta pesquisa verificou-se 61,3% multigestas e 38,7% primigestas. Além disso, verificou-se que a maioria, 58,75% (47), não completou o ensino fundamental, enquanto os autores do estudo realizado no interior paulista encontraram, 61,2%, das mulheres com este nível de escolaridade. Esses autores relacionaram esse dado com as gestantes que apresentaram IgG reagente e concluíram que quanto menor o nível de escolaridade materna maior a soropositividade.

Quanto aos fatores de risco para a doença, 35% (28) das gestantes tem contato com gatos, 32,5% (26) ingerem carnes cruas, 26,25% (21) ingerem leite cru e apenas 6,25% (5) tem hábito de ingerirem ovos crus. Estes são fatores de risco já que o leite e ovos crus contêm cistos do parasito, e gatos são hospedeiros definitivos da toxoplasmose, pois há ingestão ou inalação de oocistos encontrados em fezes de gatos

contaminados. Os resultados, quanto à presença de fatores de risco e desconhecimento da doença, são compatíveis com estudo realizado com puérperas em Cuiabá, (Leão, 2001⁵). Outro dado que aparece neste estudo é o desconhecimento das gestantes quanto à doença, 47% delas relataram desconhecer a doença e suas manifestações, o que pode justificar o fato de muitas gestantes em acompanhamento pré-natal (12%) não realizarem os testes sorológicos apontado por Kawasaki, Carvalho e Lucarevski, (2006)

No momento da coleta do material biológico para o exame, 25 gestantes encontravam-se no primeiro trimestre da gestação, 36 no segundo trimestre e 19 no terceiro trimestre, como mostrado na figura 2. O risco de transmissão para o feto no primeiro trimestre é de 6 a 14%, no segundo é de 29 a 40% e no terceiro trimestre é de 59 a 72% o risco de transmissão da doença para o feto, segundo (HINRICHSEN, *et al.* 2005³). Contudo é importante ressaltar que as consequências para o feto são mais graves quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre de gestação (MOZZATTO E SOIBELMANN PROCIANOY, 2003⁷). Nesse sentido, Margonato *et al.*, (2007), destacam a importância da implantação de protocolos clínicos de forma adequada, no que se refere à idade gestacional, ressaltando que esses podem trazer benefícios tanto do ponto de vista de proteção a saúde quanto de economia. Kawasaki, Carvalho e Lucarevski (2006) sugerem que o ginecologista solicite sorologia para toxoplasmose desde a primeira consulta pré-natal. E, ainda, segundo Spalding *et al.* (2005), o diagnóstico precoce auxilia na prevenção da transmissão, bem como de gastos desnecessários com medicamentos. Cabe salientar que a assistência a toxoplasmose na gestação, ainda é limitada em algumas localidades (KAWASAKI, CARVALHO E LUCAREVSKI, 2006⁴), o que também é realidade no município estudado.

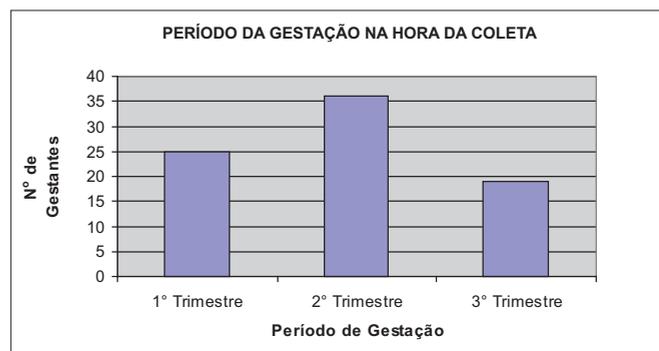


Figura 2: Período da Gestação no momento da coleta.

A partir dos resultados reagentes na triagem, avaliou-se a quantidade de anticorpos anti-toxoplasma que a gestante possuía no soro, realizando a titulação dos anticorpos. De acordo com os resultados explicitados na Figura 3, pode-se observar que a maioria das gestantes está na titulação ideal que as fornece imunidade para a doença, já que abaixo de 1/64 a proteção fetal é baixa e acima de 1/256 pode ser indício de doença recente.

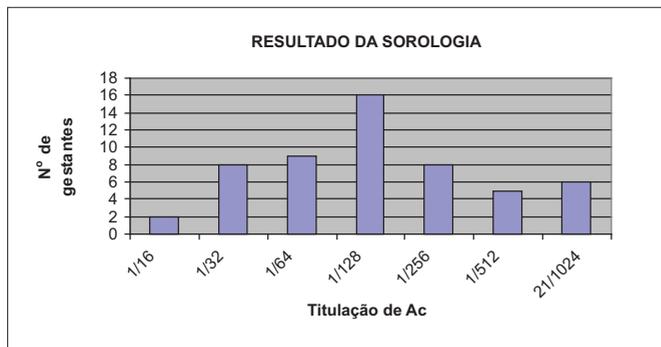


Figura 3: Titulação de anticorpos anti-toxoplasma.

CONCLUSÃO

Nenhuma das gestantes que realizaram o exame apresentaram IgM nos seus resultados, o que garante que não encontram-se na fase ativa da doença. Por outro lado, é importante considerar que 33% das mulheres não apresentaram nenhum tipo de anticorpo anti-toxoplasma, o que torna essa população suscetível ao desenvolvimento da doença e contaminação fetal principalmente porque estão expostas aos fatores de risco e desconhecem os riscos da patologia. Desta forma essas gestantes devem ser orientadas quanto aos possíveis mecanismos de contaminação e principais sintomas da doença para que possam ser tratadas e diminuir o risco de infecção fetal, caso desenvolvam a doença primária durante a gestação. Além disso, seria recomendável orientar as mulheres em idade fértil desta população sobre os riscos relacionados à patologia, principalmente para o feto, e da necessidade de uma investigação acerca da patologia antes da concepção, bem como durante o período pré-natal, principalmente para as gestantes que apresentam suscetibilidade ou infecção pelo toxoplasma.

REFERÊNCIAS

1 - CAMARGO, M.E. Toxoplasmose. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.27, p 278-86.

- 2 - GALVÁN-RAMIREZ, M.L.; GUILLEN-VARGAS, C.; SAAVEDRA-DURAN R.; ISLOS-RODRIGUEZ A. Analysis of Toxoplasma gondii antigens with sera from toxoplasmosis patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 31: 271-277, 1998.
- 3 - HINRICHSEN, S.L.; VALENTE, A.; ROLIM, H.; JUCÁ, M. Toxoplasmose. In: DIP Doenças Infecciosas e Parasitárias. HINRICHSEN, S.L. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap.48, p 421-428.
- 4 - KAWASAKI; CARVALHO; LUCAREVSKI Atenção à toxoplasmose durante a gestação em população carente do interior do Estado de São Paulo. Revista de Pediatria (São Paulo) 2006, vol. 28 no 4, p.242-250.
- 5 - LEAO, P. R. D. Toxoplasmose: Soroprevalência em Puérperas Atendidas pelo SUS em Cuiabá, Mato Grosso. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. set. 2001, vol.23, no.8, p.542-542. ISSN 0100-7203.
- 6 - MARGONATO, F.B.; SILVA, A.M.R.; SOARES, D.A.; PETRIS, A.J. Toxoplasmose na gestação: diagnóstico tratamento e importância de protocolo clínico. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, 7 (4):381-386, out/dez., 2007.
- 7 - MOZZATTO, L. SOIBELMANN PROCIANOY, R. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 45(3), 147-151, 2003.
- 8 - REIS, M.M.; TESSARO, M.M.; D'AZEVEDO, P.A. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 28(3), 158-164, 2006.
- 9 - SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA M. R.; RIBEIRO, L. C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A. P.; CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.36 n.4 Uberaba jul./ago. 2003.
- 10 - SPALDING S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 38(2): 173-177, 2005.
- 11 - VARELLA, I.S.; WAGNER, M.B.; DARELA, A.C.; NUNES, L.M.; MULLER, R.W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. Jornal de Pediatria. Vol. 79, nº1, 69-74. 2003.
- 12 - VIEGAS, C.L.; SANTOS, A. M.; ALMEIDA, A. C.; TEIXEIRA, A. A.; BARBOSA, M.P. Toxoplasmose com comprometimento pulmonar. Jornal de Pneumologia, São Paulo, v.28, n.4, jul/ago. 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Marilei Uecker Pletsch
Rua do Comércio, 3000
CEP. 98700-000 - Ijuí - RS



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Herpes Simplex 2 e Citomegalovírus Efeitos Citopáticos vs. Mecanismos de Infecção

Herpes Simplex 2 Virus and Cytomegalovirus Cytopathic Effects vs. Infection Mechanisms

Batista, A.¹; Caeiro, A.¹; Mendonça, P.¹ & Amaral, I.²

RESUMO - Os vírus, contrariamente a outras classes de agentes que afectam o organismo, não são observáveis em microscopia óptica, reflectindo-se apenas microscopicamente em efeitos citopáticos virais (ECPV), que permitem identificá-los por constituírem um conjunto de alterações patognomónicas a nível celular.

O aumento nuclear, a variação da morfologia celular, a perda do padrão da cromatina, as inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas ou a multinucleação, são alguns dos ECPV mais comuns.

Entre os vírus que afectam a mucosa genital, na família *Herpesviridae*, inserem-se o Herpes Simplex 2 e o Citomegalovírus, cujo diagnóstico deverá ter em conta a complexidade dos mecanismos de replicação.

Assim, e apesar dos vários métodos para a detecção do vírus, a citologia continua a ser um método viável para o diagnóstico destas infecções virais, sendo que a compreensão do processo de infecção contribui para a correcta avaliação microscópica.

Este trabalho tem como finalidade efetuar uma revisão bibliográfica sobre o grupo Herpes, focando o Herpes Simplex 2 e Citomegalovírus; assim como, explicar e relacionar os ECPV, associados ao grupo Herpes, tendo por base os mecanismos de infecção.

PALAVRAS-CHAVE - Efeitos Citopáticos Virais (ECPV), *Herpesviridae*, Herpes Simplex 2, Citomegalovírus, Citologia

SUMMARY - In opposite to other external agents classes, which affect the organism, viruses are not observed in light microscopy, resulting in cytopathic viral effects (CPVE). Those are a group of cellular modifications related to certain microorganisms.

The most common CPVE are: nuclear increase, variation of cellular morphology, lost of chromatin pattern, intranuclear or intracytoplasmatic inclusions and multinucleation.

The *Herpesviridae* family includes the Herpes Simplex 2 Virus and the Cytomegalovirus that affect the genital mucosa. The complex diagnostic of these viruses should considerate the replication mechanisms.

In spite of several methods of virus detection, Cytology still is a viable way to diagnose these viral infections. The understanding of the infection process contributes for a correct microscopic evaluation.

This revision hopes to remember the importance of the understanding of the replication mechanisms, which are correlated with CPVE, associated to Herpesvirus group.

KEYWORDS - Cytopathic Viral Effects (CPVE), *Herpesviridae*, Herpes Simplex 2 Virus, Cytomegalovirus, Cytology

INTRODUÇÃO

Contrariamente a outras classes de agentes externos que afectam o organismo, os vírus não são observáveis em microscopia óptica, sendo apenas detectáveis pelas suas características patognomónicas que alteram a citomorfologia. Esse conjunto de alterações denomina-se efeitos citopáticos virais (ECPV),

Assim, a correlação desses achados permite a execução de um diagnóstico citológico, com indicação do agente causal, sendo, por isso, a experiência do citotécnico de extrema importância¹. O aumento nuclear, a variação da morfologia celular, a perda do padrão da cromatina, as inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas ou a multinucleação, são alguns dos ECPV mais comuns.^{2,3}

Assim, pretende-se efectuar uma revisão bibliográfica sobre o grupo Herpes, focando principais vírus que afectam a mucosa genital – Herpes Simplex 2 (HSV2) e Citomegalovírus (CMV), bem como, explicar e relacionar os ECPV, associados ao grupo Herpes, observados em Citologia, tendo por base os mecanismos de infecção.

REVISÃO DA LITERATURA

Entre os vírus que afectam a mucosa genital, a família *Herpesviridae*, que engloba mais de 100 vírus, possui duas subfamílias que se destacam 2:

- *Alphaherpesviridae*, na qual se insere o género *Simplex Virus*, e onde se inclui a espécie *Herpes Humano 2*, designado por HSV2 ou herpes genital;

nado por HSV2 ou herpes genital;

- *Betaherpesviridae*, cujo género *Cytomegalovirus* possui como espécie principal o *Herpes Humano 5*, comumente dito como vírus citomegálico ou CMV.

Estruturalmente (fig.1) salienta-se que estes são vírus DNA de cadeia dupla linear associada a proteínas. 2

Replicação viral

A replicação viral ocorre segundo o conjunto de etapas enunciadas^{2,4,5,6} (fig.2):

- 1 – Ligação e fusão do vírus com a membrana celular.
- 2 – Migração da cápside pelos microtúbulos celulares até aos poros da membrana nuclear.
- 3 – Entrada do DNA viral no núcleo.
- 4 – Transcrição do DNA, com síntese de proteínas virais de regulação e estruturais.
- 5 – Saída do núcleo, com encapsidação aquando da passagem pela membrana nuclear.
- 6 – Libertação dos viriões por exocitose.

Achados Citológicos

Após a infecção celular e consoante o seu estágio, são observados alterações citológicas ou ECPV característicos do género viral (tab.1).

Os achados específicos do CMV são a rara multinucleação, a perda do padrão da cromatina, halos perinucleares, inclusões nucleares escuras e inclusões citoplasmáticas denominadas satélite (fig. 3A).⁷

Em relação ao HSV2 a multinucleação dá origem a células

Recebido em 15/04/2009

Aprovado em 22/07/2010

¹Instituto Politécnico de Lisboa – Escola Superior de Tecnologia de Saúde de Lisboa (ESTeSL), Portugal

²Maternidade Alfredo da Costa (MAC), Lisboa, Portugal

gigantes de Tzanck, existe modelação nuclear, perda do padrão da cromatina, halos perinucleares e ausência de inclusões citoplasmáticas. As inclusões nucleares são também observadas apresentando-se inicialmente com um aspecto claro “em vidro fosco” e evoluindo para inclusões eosinofílicas denominadas Cowdry do tipo A (fig. 3B).^{2,8,9}

EXPLICAÇÃO DOS ACHADOS

Os ECPV relacionam-se com os mecanismos de infecção viral. Essas alterações podem ser atribuídas a várias etapas da interacção entre o vírus e as células hospedeiras.²

Como demonstrado na tabela 1, a multinucleação está presente em ambos os herpesvírus. Existem várias explicações para a formação de células policarióticas atuando na infecção viral. Por um lado, a divisão da célula infectada pode ser inibida por falha na mitose, formando um sincício; por outro lado, esta multinucleação pode ter origem na fusão entre células infectadas e não infectadas. Através das glicoproteínas virais há quebra das membranas celulares e o citoplasma funde-se. A multinucleação conduz à formação de uma célula inviável, levando à morte celular.^{2,4,5,8,10,11,12}

A maturação viral coincide com alterações da cromatina, marginação e transformação desta em vesículas cheias de material dos corpos de inclusão formados pelo herpes. A inclusão pode ser um local de acumulação de proteínas virais ou ser constituídos por componentes nucleares degenerados.^{2,3,4,7,13}

No caso do HSV2, dependendo do estágio da infecção viral, podem observar-se dois tipos de inclusão distintos: inicialmente, a inclusão é clara, com aspecto de “vidro fosco”, correspondente ao local de desaparecimento da cromatina; em estádios mais tardios, o núcleo enche-se com o material de inclusão, formando corpos de Cowdry do tipo A. Estes, são inclusões amorfas, escuras, rodeadas por um halo claro, devido à marginação da cromatina.^{2,7,8,9,13,14}

No CMV, as inclusões características são eosinofílicas ou basófilas, igualmente rodeadas por um halo, dando-lhe o aspecto “olho de coruja”. O CMV pode ainda apresentar inclusões citoplasmáticas, denominadas inclusões satélite.^{3,7} São, então, estas alterações morfológicas, provocadas pelos mecanismos de infecção, que permitem o seu relacionamento com determinados tipos de vírus do grupo herpes.

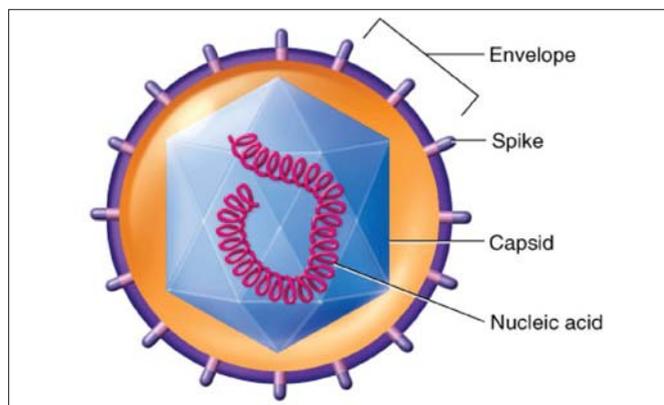


Figura 1 – Estrutura dos Herpesvírus

Fonte: http://resources.gmc.cc.ga.us/ss_center/teachers/teacher_files/11%20Viruses.ppt#7

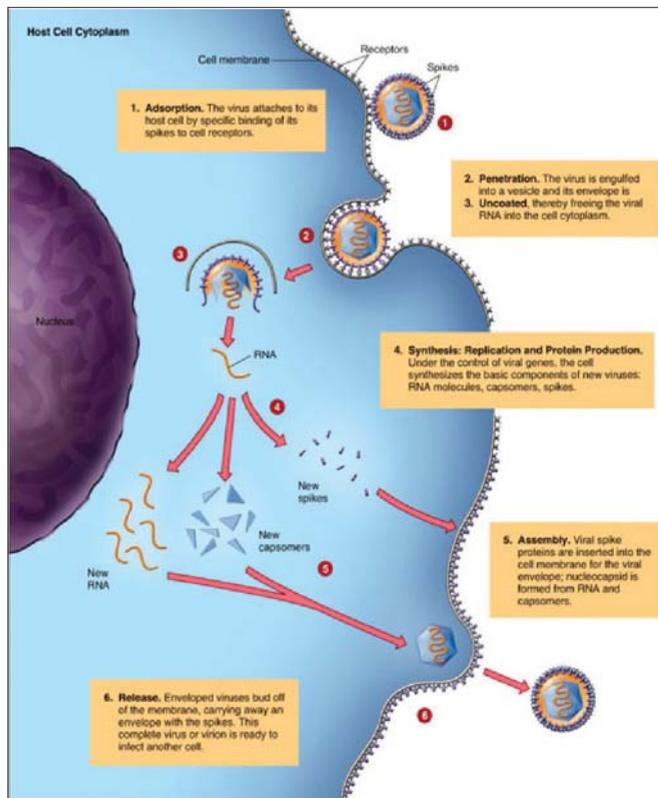


Figura 2 – Mecanismo de Replicação Viral

Fonte: http://resources.gmc.cc.ga.us/ss_center/teachers/teacher_files/11%20Viruses.ppt#2

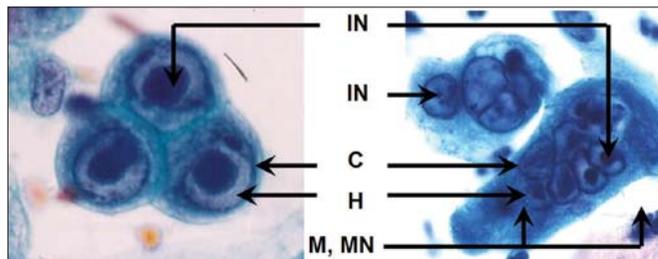


Figura 3 – ECPV sugestivos de CMV (A) e HSV2 (B), respectivamente
Fonte: <http://www.upstate.edu/courseware/cytotech/viral1.shtml>
<http://nih.techriver.net/patientImages/0169.jpg>

TABELA I
Síntese de Achados Citológicos dos Herpesvírus

Achados	CMV	HSV2
Multinucleação (M)	✓	✓
Modelação Nuclear (MN)	x	✓
Inclusões Nucleares (IN)	✓	✓
Perda do padrão da cromatina (C)	✓	✓
Halos (H)	✓	✓
Inclusões Citoplasmáticas (IC)	✓	x

CONCLUSÃO

O diagnóstico das infecções virais do grupo herpes que afectam a mucosa genital deverá ter em conta a complexidade dos mecanismos de replicação.

Assim, surgem vários métodos para a detecção do vírus que englobam técnicas: serológicas, citoquímicas, moleculares para pesquisa de genoma vírico, como, por exemplo, o *Polymerase Chain Reaction* (PCR), técnicas de imunofluorescência e imunoenzimáticas, pesquisa de partículas virais por microscopia electrónica, entre outras.^{2,14,15}

Apesar da Citologia ser descrita como um modo pouco sensível para o diagnóstico destas infecções virais¹⁵, é um método viável na medida em que é rápido e pouco dispendioso, onde a compreensão do processo de infecção contribui para a correcta avaliação microscópica. Por isso poderá ser utilizado como primeira escolha no rastreio destas infecções.

REFERÊNCIAS

- 1 – International Agency for Research of Cancer. IARC Screening Group [online]. 2008. Disponível em: URL: <http://screening.iarc.fr/>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 2 – FERREIRA, W.; SOUSA, J. Microbiologia. 1ªed. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas Lda, 2002. 3 v.
- 3 – FEIDEN, W.; BORCHARD, F.; BÜRRING, K.; PFITZER, P. Herpes oesophagitis. *Vichows Arch*, 404 (2): 167-176, 1984. Disponível em: URL: <http://www.springerlink.com/content/tu5j0742p10m8h46/>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 4 – BROWNE, H.; BRUUN, B.; MINSON, A. Characterization of herpes simplex virus type 1 recombinants with mutations in the cytoplasmic tail of glycoprotein H. *J Gen Virol*, 77: 2569-2573, 1996. Disponível em: URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/77/10/2569.pdf>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 5 – ALBRECHT, T.; FONS, M.; BOLDOGH, I.; RABSON, A. Effects on Cells [online]. s.d. Disponível em: URL: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch044.htm>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 6 – Hunt, R. Herpes Viruses [online]. 2007. Disponível em: URL: <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 7 – MCKEE, A. The biology of herpes simplex virus. *Inv Ophthal*, 2 (5): 490-

497,1963. Disponível em: URL: <http://www.iovs.org/cgi/reprint/2/5/490.pdf>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008

- 8 – Upstate Medical University. Cytotechnology [online]. 2002. Disponível em: URL: <http://www.upstate.edu/courseware/cytotech/>. Acesso em 27 Fevereiro de 2008.
- 9 – Hasteh, F. Cervix-Cytology [online]. 2008. Disponível em: URL: <http://www.pathologyoutlines.com/cervixcytology.html>. Acesso em 05 de Março de 2008.
- 10 – HIGUCHI, H., BRONK, S., BATEMAN, A., HARRINGTON, K., VILE, R., GORES, G. Viral Fusogenic Membrane Glycoprotein Expression Causes Syncytia Formation with Bioenergetic Cell Death: Implications for Gene Therapy, *Cancer Res*, 60: 6396-6402, 2000. Disponível em: URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/60/22/6396>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 11 – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Patogenia de Infecções Virais [online]. s.d. Disponível em: URL: http://www.iptsp.ufg.br/download/Virus_patogenia_VET.pdf. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 12 – ENLANDER, D.; DREW, L.; HOO, R.; EVERHART, T.; SCOTT, T. The Cytopathic Effect of Herpes Simplex Virus on HEp-2 Cells as shown by Scanning Electron Microscopy, *J Gen Virol*, 15: 313-316, 1974. Disponível em: URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/25/2/313.pdf>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 13 – REISSIG, M., MELNICK, J. The cellular changes produced in tissue cultures by herpes b virus correlated with the concurrent multiplication of the virus. *J Exp Med*, 101: 341-352, 1955. Disponível em: URL: <http://www.jem.org/cgi/content/abstract/101/3/341>. Acesso em 27 de Fevereiro de 2008.
- 14 – American Society of Cytopathology. NCI Bethesda System [online]. s.d. Disponível em: URL: <http://nih.techriver.net/>. Acesso em 05 de Março de 2008.
- 15 – FIEL-GAN, M.; VILLAMIL, C.; MANDAVILLI, S.; LUDWIG, M.; TSONGALIS, G. Rapid Detection of HSV from Cytologic Specimens Collected into ThinPrep Fixative. *Act Cytol*, 43: 1034-1038, 1999. Disponível e: URL: http://www.acta-cytol.com/toc/auto_abstract.php?id=13542. Acesso em 05 de Março de 2008.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Paula Mendonça
Av. D. João II ST. 4.69.01
Lisboa - Portugal (1990-069)



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Determinação do marcador Anti-HBc na prevenção da transmissão transfusional do vírus da Hepatite B: importância e implicações

Anti-HBc determination to prevent the post-transfusional Hepatitis B infection: importance and implications

Aline B. Wohlfahrt¹, Sandra T. Beck², Aline Foletto¹ & Adrienne Ceccim³

RESUMO - Para determinar a presença do perfil sorológico sugestivo de Hepatite B oculta, foram analisados os marcadores HBsAg e os anticorpos anti-HBc e anti-HBs de 7896 doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria -RS, no período de abril de 2007 a agosto de 2008. Foi estimada uma prevalência de 0,86% para o marcador anti-HBc, sendo este marcador o único detectado em 0,11% dos indivíduos estudados. Tentar esclarecer e orientar o acompanhamento destes pacientes é importante para iniciar tratamento adequado, se necessário, ou evitar que estes indivíduos se tornem ansiosos com a possibilidade de serem portadores de doença infecciosa crônica.

PALAVRAS-CHAVE - Hepatite B oculta; anti-HBc; doadores de sangue

SUMMARY - In order to determine the presence of a serological profile that suggest occult Hepatitis B virus infection (anti-HBc alone), we analyzed the serological markers HBsAg and the antibodies anti-HBc and anti-HBs to virus B from 7896 blood donors of Blood Transfusion Center at University Hospital of Santa Maria, between April, 2007 and August, 2008. The prevalence estimated of anti-HBc marker was 0,86% in whole studied population. In 0,11% of the blood donors it was the only marker present. Know the serological profile of these donors is important to implement a right treatment if necessary and to avoid the patient's anxiety.

KEYWORDS - Occult hepatitis B; anti-HBc; blood donors

INTRODUÇÃO

As hepatites virais são um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (3).

Em infecções pelo Vírus da Hepatite B (VHB), ocorrem várias alterações histológicas no fígado, desde a hepatite aguda, passando pelos fenômenos reacionais leves até as formas mais graves, que incluem as hepatites crônicas com graus variados de lesão histológica, a cirrose e o carcinoma hepatocelular (24). O VHB é altamente infectante e sabe-se que uma só partícula viral é capaz de contaminar o ser humano (12). Sua transmissão pode ocorrer pela via parenteral (sangue ou produtos sanguíneos), sexual (sêmen e secreção vaginal), vertical (de mãe para filho através da placenta e leite materno) ou por solução de continuidade (pele e mucosa) (3).

O antígeno de superfície do vírus B (HBsAg) é o marcador característico da infecção pelo VHB. O aparecimento do anticorpo contra antígeno de superfície (anti-HBs) marca a recuperação da hepatite B. O anticorpo anti-HBs confere imunidade quanto presente em níveis superiores a 10mUI/mL e, em muitos pacientes, esse anticorpo persiste por toda a vida, conferindo assim imunidade a longo prazo. O anticorpo contra proteínas do núcleo (anti-HBc) da classe IgM é o primeiro anticorpo a ser detectado durante uma infecção aguda. É o único marcador da infecção pelo VHB durante o período de janela imunológica, que consiste entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anti-HBs. Numa infecção recente pelo VHB, o anti-HBc IgM apresenta-se em títulos altos; porém, esse anticorpo pode ser detectado em títulos baixos numa infecção crônica, em períodos de reagudização. Durante a recuperação, o título de anti-HBc IgM diminui enquanto aumenta o título de anti-HBc da classe IgG, o qual indica uma infecção pelo VHB crônica ou passada (22).

O marcador capaz de diferenciar esta situação é o anti-HBs, que estará indetectável em portadores crônicos, mesmo se

submetidos à vacinação (10). Já, indivíduos que tem como único marcador a presença de anti-HBc, mas que respondem bem à vacinação, podem apenas estar apresentando baixos títulos de anticorpos anti-HBs, não detectados sorologicamente. Contudo, após apresentarem resposta vacinal serão considerados imunes (29).

A forma crônica da hepatite B é caracterizada pelo estado de portador do HBsAg por mais de seis meses, aumento da alanina aminotransferase (persistente ou intermitente), níveis séricos de HBV-DNA excedendo 10^5 a 10^6 cópias por mL e atividade histológica necroinflamatória hepática (21). Para o controle da infecção pelo VHB por hemoderivados, desde 1989 vêm sendo praticada no Brasil a pesquisa do HBsAg nos doadores de sangue (4). Em 1993, foi acrescentada a pesquisa sorológica do anticorpo anti-HBc (5,23). A introdução desse último teste na triagem dos doadores de sangue diminuiu ainda mais a incidência da hepatite B pós-transfusional que, eventualmente, ainda ocorria por meio de sangue HBsAg-negativo, mas anti-HBc-positivo (8,18,34).

A partir desta triagem, foram identificados pacientes apresentando o anticorpo anti-HBc isolado (HBsAg-negativo, anti-HBc-positivo, anti-HBs-negativo), que apresentam um perfil sorológico considerado indefinido, podendo ser indivíduos que apresentam uma infecção resolvida, portadores crônicos com baixa produção de HBsAg ou pessoas com anti-HBc falso-positivo (1,15).

Doadores com reatividade apenas para o anticorpo anti-HBc (anti-HBc isolado) necessitam de acompanhamento e esclarecimento sobre a sua situação, uma vez que, usualmente, tornam-se ansiosos e preocupados com a possibilidade de serem portadores de doença infecciosa crônica e potencialmente agressiva (33).

Devido à importância da identificação e acompanhamento destes pacientes, o presente estudo teve como objetivo apresentar a prevalência de indivíduos que possuem perfil sorológico de anti-HBc isolado sugestivo de infecção oculta

Recebido em 15/04/2009

Aprovado em 19/08/2010

¹Aluna do curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)- RS

²Profª Drª da disciplina de Imunologia Clínica. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Curso de Farmácia, UFSM - RS

³Farmacêutica Bioquímica do Banco de Sangue-Hospital Universitário de Santa Maria

pelo VHB entre os doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)- RS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os resultados das pesquisas sorológicas de marcadores da infecção pelo VHB foram obtidos e analisados após triagem sorológica de rotina de 7896 doadores do Banco de Sangue do HUSM.

O levantamento dos dados foi realizado através dos registros encontrados no arquivo do Banco de Sangue do HUSM, entre o período de 01 de abril de 2007 a 19 de agosto de 2008. Os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc foram pesquisados durante a rotina de triagem de doadores do Banco de Sangue e a pesquisa do anticorpo anti-HBs, solicitada ao Setor de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM. Foram utilizados testes imunoenzimáticos comerciais, (MEIA-Axym® -Abbot-USA) implantados e validados na rotina de cada setor.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob o protocolo nº 0014.0.243.000-07.

RESULTADOS

A triagem sorológica para Hepatite B em doadores de sangue é realizada através da determinação dos marcadores HBsAg e anti-HBc total. A prevalência destes marcadores na população estudada encontra-se descrita na tabela 1.

TABELA I
Prevalência sorológica dos marcadores HBsAg e anti-HBc na população estudada

Doadores	Marcadores de Hepatite B	
	HBsAg	Anti-HBc
Reagente n (%)	4 (0,05)	68 (0,86)
Não reagente (n)	7892	7828
Total (n)	7896	7896

Entre os indivíduos anti-HBc reagentes (n = 68), foi analisada a presença associada de outro marcador sorológico para VHB. Porém, não foi possível determinar a presença de anti-HBs em todos indivíduos (tabela 2).

TABELA II
Perfil sorológico dos indivíduos anti-HBc reagentes

HBsAg	Anti-HBs			TOTAL
	Reagente n (%)	Não reagente n (%)	Não determinado n (%)	
Reagente	0	4 (5,9)	0	4
Não reagente	32 (47)	9 (13,2)	23 (33,8)	64
TOTAL	32	13	23	68

Entre os indivíduos apresentando sorologia não reagente para HBsAg e reagentes para anticorpos anti-HBc, que retornaram para a pesquisa de anti-HBs (n = 45), pôde-se observar a presença isolada do marcador anti-HBc em 20% (9/45), (figura 1).

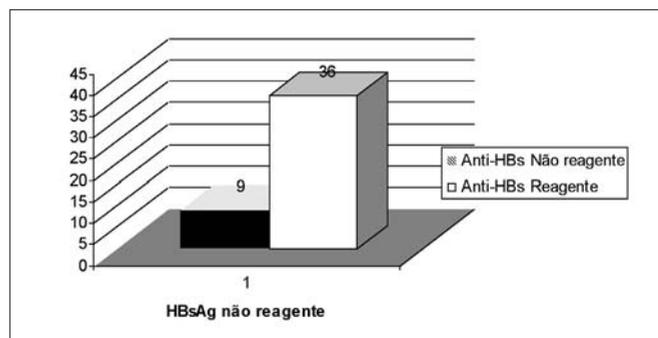


Figura 1: Frequência do marcador anti-HBc isolado na amostra avaliada.

A frequência de anti-HBc isolado na população de 7896 doadores avaliados foi de 0,11% (9/7896).

DISCUSSÃO

A Hepatite B é a mais freqüente das doenças de transmissão parenteral detectada durante triagem para doação de sangue (31).

A infecção viral persiste mesmo após a recuperação da hepatite aguda, podendo o vírus persistir por muitos anos no fígado e nos linfócitos, às vezes por toda a vida, com baixos níveis de replicação, muitas vezes com persistência de inflamação hepática (25).

Os primeiros marcadores a serem produzidos após a exposição ao VHB são os anticorpos contra o "core" (núcleo) do vírus da hepatite B (anti-HBc), estando presentes já na fase aguda da doença e geralmente persistindo durante toda a vida após o contágio. É usualmente detectado junto com o antígeno de superfície (HBsAg) nas hepatites B agudas e crônicas e junto com o anti-HBs nas infecções resolvidas (HBsAg não reagente no prazo de 6 meses) (28).

A frequência de 0,86% de doadores de sangue com o marcador anti-HBc reagente encontrada no presente estudo (tabela 1), mostrou-se semelhante à descrita em estudo realizado com doadores de sangue do HUSM de Santa Maria, no período de 01 de janeiro de 2006 a 31 de março de 2007, o qual relata uma frequência de 0,8%. A prevalência de 0,05% doadores, apresentando HBsAg reagente (tabela 1), também se manteve constante confirmando os resultados obtidos anteriormente (11). Estes doadores apresentam infecção aguda ou crônica pelo VHB, sendo comumente encaminhados a um serviço médico especializado e submetidos a um exame físico, avaliação da função hepática e pesquisa de marcadores de replicação do VHB, para determinar a fase da infecção.

Entre os indivíduos que apresentaram o marcador anti-HBc reagente, 47,0% (32/68) foram não reagentes para HBsAg e reagentes para anti-HBs (tabela 2). Estes pacientes apresentam perfil sorológico de infecção resolvida, pois são considerados imunes, já que o anti-HBs, quando presente em níveis superiores a 10mUI/mL, confere proteção. Este anticorpo tem propriedades neutralizantes, impedindo a entrada do vírus na célula (3).

Cabe ressaltar que a infectividade do VHB depende de vários fatores, incluindo o número de cópias do DNA viral. Na presença de anticorpos anti-HBs, níveis baixos de partí-

culas virais do DNA, potencialmente detectáveis por métodos moleculares com alta sensibilidade, podem ser neutralizadas pelo anticorpo presente, tornando o sangue com poder infectante negligenciável (19). Apesar disto, indivíduos anti-HBs positivos são excluídos como doadores de sangue.

O marcador anti-HBc pode vir a apresentar reatividade na pesquisa sorológica devido aos seguintes fatores: 1) reações sorológicas falso-positivas: o que vem ocorrendo com menor frequência devido ao desenvolvimento de novos reagentes comerciais com ótima especificidade; 2) fase de "janela imunológica": observada nas infecções agudas em resolução, quando o HBsAg já se negativou e o anti-HBs ainda não é detectado, surgindo algumas semanas depois; 3) expressão de imunidade tardia: quando os níveis do anti-HBs decaem abaixo do limite de detecção dos testes e o anti-HBc permanece positivo, provavelmente em razão da maior imunogenicidade do HBcAg; 4) infecção crônica, onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer concomitantemente com uma carga viral baixa do VHB, e o HBsAg não é detectado pelos métodos sorológicos habituais. Estes casos têm sido rotulados como "infecção oculta pelo VHB" (IOB) (2,6,35).

As IOBs possuem diversas implicações clínicas como: 1) transmissão por transfusão de sangue, hemoderivados e transplante de órgãos; 2) hepatites criptogênicas, fulminantes e exacerbações da hepatite crônica B; 3) desenvolvimento de carcinoma hepatocelular; 4) progressão da doença em resposta ao tratamento da hepatite C (16). Constituem-se hoje no maior risco de infecção pós-transfusional pelo VHB em diversos países (20).

Diversos estudos com doadores anti-HBc isolados evidenciam infecção pós-transfusional de hemoderivados e transplante de órgãos sólidos adquiridos (2,26,35), com taxas de infectividade alcançando 17% (26). Na casuística estudada, foram identificados entre os 68 indivíduos com o marcador anti-HBc reagente, 13,2% de doadores com perfil sorológico sugestivo da IOB (tabela 2), o que corresponde a 20% dos indivíduos com pesquisa de anti-HBs realizada (fig 1). Em relação a população total de doadores, estes dados correspondem a 0,11% (9/7896) da população que precisaria ser orientada a fazer uma pesquisa mais completa para verificar possível estado infeccioso pelo VHB.

A persistência da replicação do VHB após a hepatite aguda reforça a necessidade da triagem sorológica de doadores de sangue com o anti-HBc e ressalta a importância da adoção de testes de ácidos nucleicos (NAT), para evitar a transmissão de hepatite B a partir de doadores de sangue soronegativos (30). Os NATs são específicos e extremamente sensíveis para detecção da hepatite B oculta, por detectar o DNA viral, diminuindo o risco de hepatites pós-transfusionais (24). Muitos autores consideram esse método a tecnologia ideal para ser utilizada na rotina. Entretanto, não seria factível, tanto pelo custo como pela carência de estrutura do nosso país. Por isto a grande importância de determinar a presença do anticorpo anti-HBc.

Um estudo recente, realizado em doadores de sangue brasileiros, com anti-HBc isolado, avaliou o resultado da vacinação contra a hepatite B em relação à soroconversão para anti-HBs e à presença do DNA do VHB. Após três doses da vacina específica, 90% dos doadores de sangue exibiram níveis de anti-HBs acima de 10mUI/mL. Além disso, utilizando um teste de PCR com limite de detecção de 100 cópias de DNA/mL, todos os doadores portadores de possível infecção oculta pelo VHB que foram vacinados apresentaram resultado negativo na pesquisa do DNA viral após a vacinação, sugerindo a possibilidade da eliminação do estado de portador oculto do VHB. Tais achados permi-

tem considerar que o estímulo imunológico desencadeado pela imunização contra o VHB poderia cursar tanto com a resolução de IOBs, quanto com a soroconversão do anti-HBs em indivíduos anti-HBc isolados (28).

Indivíduos que continuam com anti-HBc isolado após três ou quatro doses de vacina necessitam de exames moleculares e um acompanhamento mais atento.

A estimulação do sistema imune, com uma dose da vacina contra a hepatite B, torna-se uma maneira alternativa de investigação da IOB (32); pois, os indivíduos imunes normalmente se tornarão positivos para o anti-HBs rapidamente, enquanto os "portadores-ocultos" deverão continuar negativos para este anticorpo (32).

Com a realização de NAT, tem sido demonstrado que mesmo pessoas com perfil sorológico de cura (anti-HBc e anti-HBs positivos) podem sofrer reativação viral, se estiverem portando o VHB em níveis apenas detectáveis por testes moleculares de grande sensibilidade, e forem submetidos à intensa imunossupressão, como pacientes recebendo quimioterapia antineoplásica (9). Contudo, na ausência de tal situação, estes indivíduos parecem ter viremia controlada e, provavelmente, só apresentem o VHB em núcleo de hepatócitos e em algumas células do sistema imune (33). Além disto, as complicações do VHB estão fortemente associadas à carga viral elevada (7). Então, os indivíduos HBsAg-negativos, anti-HBc e anti-HBs positivos, que apresentam baixa carga viral, terão baixíssimo risco de complicações (13), o que tranquiliza o doador apresentando este perfil sorológico no momento da triagem sorológica para a doação.

Pacientes aparentemente saudáveis apresentam a IOB associada clinicamente a quatro condições: 1) recuperação da infecção, definida pela presença do anti-HBs; 2) hepatite crônica, com infecção relacionada à presença de cepas mutantes não detectadas pelos testes sorológicos convencionais; 3) hepatite crônica em portadores em fase assintomática que apresentam anti-HBc detectável, com ou sem a presença de anti-HBe; 4) hepatite crônica ou portadores assintomáticos que têm no VHB-DNA o único marcador detectável (2).

Atualmente, pouco se sabe sobre a evolução em longo prazo de indivíduos com anti-HBc isolado. Como a IOB cursa na maioria das vezes com viremia baixa (17,28), os pacientes evoluem freqüentemente como portadores assintomáticos do vírus (14), sem necessidade de tratamento específico para a hepatite B. No entanto, algumas publicações sugerem risco aumentado em indivíduos com IOB de progressão para cirrose e hepatocarcinoma (6)- principalmente quando em associação com o HCV (27)- e reativação viral em vigência de imunossupressão (6).

Estes fatos levam a concluir que o esclarecimento da situação e a identificação dos indivíduos com o perfil sorológico sugestivo de IOB entre os doadores de sangue mostram-se imprescindíveis, mesmo que a prevalência seja baixa como a descrita no presente estudo.

A orientação e o acompanhamento correto destes doadores são necessários não só para evitar que estes indivíduos se tornem ansiosos e preocupados com a possibilidade de serem portadores de doença infecciosa crônica e potencialmente agressiva, mas também para a segurança de se realizar uma transfusão sem risco de transmissão da infecção.

REFERÊNCIAS

- 1- ALHABABI, F.; SALLAM, T. A. & TONG, C. Y. W. The significance of "anti-HBc only" in the clinical virology laboratory. *J. Clin. Virol*, 27: 162-169, 2003.
- 2- ALLAIN, J. P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang.*, 86: 83-91, 2004.

- 3- BRASIL. Ministério da Saúde. Hepatites Virais. O Brasil está atento. Série Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF, 2003.
- 4- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 721, de 9 de agosto de 1989.
- 5- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 1376, de 19 de novembro de 1993.
- 6- CHEMIN, I. & TREPÓ, C. Clinical impact of occult HBV infections. *J. Clin. Virol*, 34 (1): S15-S21, 2005.
- 7- CHEN, C.J.; YANG, H.I.; SU, J.; JEN, C.L.; YOU, S.L.; LU, S.N.; HUANG, G.T.; ILOEJE, U.H.; REVEAL-HBV Study Group Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 295: 65-73, 2006.
- 8- COELHO, H.S.M. & NOGUEIRA, C.M. A hepatite pós-transfusional e a política de doação de sangue no Brasil. *Gast. End. Dig.*, 14: 69-71, 1995.
- 9- DHÉDIN, N.; DOUVIN, C.; KUENTZ, M.; SAINT, MARC M.F.; REMAN, O.; RIEUX, C.; BERNAUDIN, F.; NOROL, F.; CORDONNIER, C.; BOBIN, D.; METREAU, J.M.; VERNANT, J.P. Reverse seroconversion of hepatitis B after allogeneic bone marrow transplantation: a retrospective study of 37 patients with pretransplant anti-HBs and anti-HBc. *Transplant.*, 66: 616-619, 1998.
- 10- DIENSTAG, J.L.; STEVENS, C.E.; BHAN, A.K.; SZMUNESS, W. Hepatitis B vaccine administered to chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Ann. Intern. Med.*, 96: 575-579, 1982.
- 11- FOLETTO, A. S.; DALMORA, C. H. & BECK, S. T. Hepatite B oculta entre doadores de sangue: importância do estudo do perfil sorológico da Hepatite B em indivíduos anti-HBc positivos. *Saúde*, 34 (2): 39-43, 2008.
- 12- FONSECA, J. C. F. História natural da hepatite crônica B. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 40 (6): 672-677, 2007.
- 13- de FRANCHIS, R.; MEUCCI, G.; VECCHI, M.; TATARELLA, M.; COLOMBO, M.; DEL NINNO, E.; RUMI, M.G.; DONATO, M.F.; RONCHI, G. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann. Intern. Med.*, 118: 191-194, 1993.
- 14- GROB, P.; JILG, W.; BORNHAK, H.; GERKEN, G.; GERLICH, W.; GÜNTHER, S.; HESS, G.; HÜDIG, H.; KITCHEN, A.; MARGOLIS, H.; MICHEL, G.; TREPO, C.; WILL, H.; ZANETTI, A.; MUSHAHWAR, I. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J. Med. Virol.*, 62: 450-455, 2000.
- 15- HENNIG, H.; PUCHTA, I.; LUHM, J.; SCHLENKE, P.; GOERG, S.; KIRCHNER, H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*; 100: 2.637-2.641; 2002.
- 16- HU, K. Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J. Viral Hep.* 9 (4): 243-57, 2002.
- 17- HUO, T.I.; WU, J.C.; LEE, P.C.; CHAU, G.Y.; LUI, W.Y.; TSAY, S.H.; TING, L.T.; CHANG, F.Y.; LEE, S.D. Seroclearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers do not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology*, 28: 231-236, 1998.
- 18- Japanese Red Cross non-A, non-B hepatitis research group. Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet*, 338: 1.040-1.041, 1991.
- 19- KLEINMAN, S.H.; KUHNS, M.C.; TODD, D.S.; GLYNN, S.A.; MCNAMARA, A.; DIMARCO, A.; BUSCH, M.P. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion*, 43: 696-704, 2003.
- 20- LIU, C.J.; LO, S.C.; KAO, J.H.; TSENG, P.T.; LAI, M.Y.; NI, Y.H.; YEH, S.H.; CHEN, P.J.; CHEN, D.S. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *J. Hepatology*, 44: 39-46, 2006.
- 21- LOK, A. S. F. & MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 45: 507-539, 2007.
- 22- MARINHO, C. & AGOSTINHO, C. Hepatite B. Disponível em: http://www.aidsportugal.org/hepatites/46_91.pdf/. Acesso em 18 de novembro de 2008.
- 23- MARTELLI, C.M.; TURCHI, M.; SOUTO, F.J.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; ANDRADE, A.L.; ZICKER, F. Anti-HBc testing for blood donations in areas with intermediate hepatitis B endemicity. *Rev. Panam. Salud Públ.*, 6: 69-73, 1999.
- 24- MELLO, E. S. & ALVES, V. A. F. Anatomia Patológica da Hepatite B. *Braz J Infect Dis*, 10 (1), 2006.
- 25- MICHALAK, T.I.; PARDOE, I.U.; COFFIN, C.S.; CHURCHILL, N.D.; FREAKE, D.S.; SMITH, P.; TRELEGAN, C.L. Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis. *Hepatology*, 29 (3): 928-38, 1999.
- 26- MOSLEY, J.W.; STEVENS, C.E.; AACH, R.D.; HOLLINGER, F.B.; MIMMS, L.T.; SOLOMON, L.R.; BARBOSA, L.H.; NEMO, G.J. Donor screening for antibodies to hepatitis B core antigen and hepatitis H virus infection in transfusion recipients. *Transfusion*, 35: 5-12, 1995.
- 27- PATERLINI, P.; DRISS, F.; NALPAS, B.; PISI, E.; FRANCO, D.; BERTHELOT, P.; BRÉCHOT, C. Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancer from HBsAg negative patients: a study of a low-endemic area. *Hepatology*, 17: 20-9, 1993.
- 28- PEREIRA, J.S.; GONÇALES, N.S.; SILVA, C.; LAZARINI, M.S.; PAVAN, M.H.; FAIS, V.C.; GONÇALES JÚNIOR, F.L. HBV vaccination of HCV-infected patients with occult HBV infection and anti-HBc-positive blood donors. *Braz J Med Biol Res.*, 39: 525-31, 2006.
- 29- PERRILLO, R.P.; BODICKY, C.; CAMPBELL, C.; SANDERS, G.E. Response to hepatitis B virus vaccine in subjects with low levels of antibody to hepatitis B surface antigen. *N. E. J. Med.*, 310: 1463, 1984.
- 30- PINHO, J. R. R. Diagnóstico contemporâneo da hepatite B oculta ou críptica. *Einstein*, (1): 32-8, 2005.
- 31- SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; BARRETO, C.C.; BARRETO, A.M.; OTANI, M.M.; CHAMONE, D.F. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue / hemocentro de São Paulo. *Rev. Panam. Salud Públ.*, 13: 111-116, 2003.
- 32- SOUTO, F.J.D.; OZAKI, K.S.; PEREIRA, E.S.P.; SOUSA, K. M.; SILVEIRA, W.N.; PACHECO, M.S. Efeito da vacina contra hepatite B em indivíduos com anticorpos contra o antígeno central da hepatite B (anti-HBc) como único marcador. *Gastroenterol Endosc Digest*, 20: 43-47, 2001.
- 33- SOUTO, F.J.D.; RODRIGUES, E.N.; FORTES, H.M.; SALDANHA, A.A. Soroconversão do anti-HBs após vacina contra hepatite B em doadores de sangue HBsAg-negativos, anti-HBc-positivos na rede pública de saúde, Mato Grosso, Brasil. *Rev. Patol. Trop.*, 35 (3): 205-211, 2006.
- 34- SKINHOJ, P. Hepatitis and hepatitis B-antigen in Greenland. Occurrence and interrelation of hepatitis B associated surface, core and e antigen-antibody system in a highly endemic area. *Am. J. Epidemiol*, 105: 99-106, 1977.
- 35- ZANETTI, A.R.; ROMANÒ, L.; ZAPPÀ, A.; VELATI, C. Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply. *J. Clin. Virol*, 36 (1): S51-S5, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Sandra T. Beck
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Prédio 26, sala 1216
 Universidade Federal de Santa Maria - Campus Universitário - Camobi
 Santa Maria, RS
 E-mail: sbeck@ig.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

Variabilidade biológica na concentração de lipídeos séricos em idosos

Biological variability in concentration of serum lipids in elderly

Daniele da Costa¹ & Darlene Camati Persuhn²

RESUMO - As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortalidade no mundo. O perfil lipídico caracterizado por dosagens de colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol e cálculo do LDL colesterol, é o principal instrumento na avaliação de doenças cardiovasculares. Diante de um resultado laboratorial, é necessário considerar que existem muitas variáveis que contribuem para as flutuações de resultados sem justificativa clínica aparente. Estes fatores podem ser analíticos, pré-analíticos, ou biológicos, chamado de variabilidade biológica. Faz-se necessário quantificar a porcentagem de variação biológica presente nos resultados de uma determinada dosagem laboratorial. A proposta deste trabalho foi avaliar a variabilidade biológica da determinação de lipídeos séricos em idosos. Foram avaliados o perfil lipídico sérico de 16 pacientes idosos, sendo 8 homens e 8 mulheres, durante o período de 4 semanas, tendo um total de 8 coletas; no município de Luis Alves-SC. A variabilidade biológica na determinação de todos os analitos lipídicos avaliados neste trabalho foi menor que as encontradas em indivíduos jovens. Não houve diferença entre as variabilidades médias de homens e mulheres. O grupo que utilizava medicamentos de uso contínuo apresentou variabilidades biológicas médias menores que o grupo de pacientes que não fazia uso de nenhum medicamento. Portanto, o uso de medicamentos não afeta de forma a incrementar a variabilidade biológica na determinação de lipídeos séricos.

PALAVRAS-CHAVE - Variabilidade biológica, idosos, lipídeos

SUMMARY - Cardiovascular diseases are a major cause of mortality worldwide. The lipid profile characterized by levels of total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol and calculation of LDL cholesterol is the main tool in the evaluation of cardiovascular diseases. Before a laboratory result, it is necessary to consider that there are many variables that contribute to the fluctuations of results without apparent clinical justification. These factors can be analytical, pre-analytical, or biological, called biological variability. It is necessary to quantify the percentage of biological variation present in the results of a laboratory assay. The purpose of this study was to assess the biological variability of the determination of serum lipids in elderly. We assessed the serum lipid profile of 16 patients, 8 men and 8 women during the 4 weeks, with a total of 8 samples in the municipality of Luis Alves-SC. The biological variability in the determination of all lipid analytes evaluated in this study was lower than those found in young individuals. There was no difference between the variability of average men and women. The group that used continuous use of drugs had average lower biological variability than the group of patients who had no use of any medicine. Therefore the use of drugs does not affect in order to increase the biological variability in the determination of serum lipids.

KEYWORDS - biological variability, elderly, lipids

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma afecção das artérias de grande e médio calibre, caracterizada por lesões com aspectos de placas (ateromas); tem início insidioso a partir da infância, evolução lenta e silenciosa, e suas manifestações clínicas na vida adulta repercutem sob diversas condições mórbidas do aparelho circulatório que culminam nas elevadas taxas de mortalidade, (GIANINI, 1998).

A doença arterial coronariana (DAC) secundária à aterosclerose destaca-se nos dias atuais como a principal causa de morbidade e mortalidade nas sociedades industrializadas, (ROMALDINI *et al.*, 2004).

Dados demográficos caracterizam o grande aumento da população idosa que será cada vez maior com o passar das décadas. O envelhecimento é o maior fator de risco para doenças crônicas, especialmente doenças cardiovasculares, muitas vezes resultantes de alterações no perfil lipídico do idoso, (ENGROFF *et al.*, 2008).

Segundo a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (IV DBSD, 2007), durante os últimos 30 anos, houve um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil.

A dislipidemia, condição na qual há concentrações anormais de lipídeos ou lipoproteínas no sangue é um fator de

risco importante para o desenvolvimento de complicações da aterosclerose, (ROMALDINI *et al.*, 2004).

A avaliação laboratorial das dislipidemias, segundo a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, (IV DBSD, 2007), é definido pela determinação bioquímica do perfil lipídico, o colesterol, o colesterol ligado a HDL, triglicerídeos e do colesterol ligado a LDL após jejum de 12 a 14 horas.

O ideal seria que sempre que um exame laboratorial fosse realizado, o valor fosse exatamente o mesmo desde que a condição fisiológica ou patológica do paciente não houvesse alterado, (ZIMATH *et al.*, 2007). Entretanto, sabe-se que isso não ocorre e que existe uma variação muitas vezes significativa entre duas dosagens laboratoriais do mesmo analito. Em algumas situações, esta variação tem sido utilizada como recurso analítico, como é o caso da hemoglobina glicada, cuja variação, sabidamente relacionada às variações analíticas dependentes das flutuações da glicemia, representa o controle do paciente portador de diabetes, (McCARTER *et al.*, 2004; McCARTER; HEMPE; CHALEW., 2006).

Assim, muitos fatores, além da doença, afetam a composição dos líquidos orgânicos e conseqüentemente alterando o resultado de análises bioquímicas; tais fatores podem ser pré-analíticos ou analíticos. Sempre que possível, a variabilidade pré-analítica deve ser avaliada para que seja facilitada a correta interpretação dos resultados dos testes, (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Recebido em 15/04/2009

Aprovado em 29/07/2010

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CURSO DE FARMÁCIA

NIQFAR – NUCLEO DE ESTUDOS DE INVESTIGAÇÕES QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

¹Acadêmica do Curso de Farmácia – UNIVALI

²Doutora em Ciências. Bioquímica (UFPR). Professora dos Cursos de Farmácia e medicina - UNIVALI

Na IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, (IV DBSD) consta que, caso a variação entre duas dosagens seja superior à máxima aceitável, deve-se suspeitar de interferências pré-analíticas ou analítica.

Segundo Burtis e Ashwood, (2001), existe influência biológica da idade nos líquidos do organismo de idosos, e aumentos significativos na concentração do plasma de muitos constituintes ocorrem em mulheres após a menopausa, condição que acontece após 60 anos. A secreção diminuída de estrogênio pode ser responsável pelo aumento de colesterol no soro.

Os idosos são potencialmente acometidos de doenças crônicas graves extremamente prevalentes, especialmente, dislipidemias, (SBC, 2007), diabetes, (SBD, 2006) e hipertensão, (V DBSD, 2007). A análise laboratorial de lipídeos tem sido considerada muito importante para monitorar o risco cardiovascular de idosos portadores ou não destas doenças crônicas (HAYASI *et al.*, 2008).

Diante disso, levanta-se a seguinte questão: qual a variabilidade biológica será encontrada em idosos?

População analisada

Foram analisados os soros de 15 pacientes idosos com mais de 65 anos, em quatro diferentes parâmetros: colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, e triglicerídeos.

Critérios de inclusão no estudo: idade superior a 65 anos, não estar acamado, não contrair doença infecto-contagiosa durante o estudo, poder deslocar-se até o laboratório.

Critérios de exclusão: estar em dieta de redução de peso e estar realizando tratamento medicamentoso que será interrompido durante a coleta de dados

Os pacientes tiveram seu peso controlado e não foram excluídos pacientes que fazem uso de medicamentos de uso contínuo. Foi investigada a mudança na rotina dos pacientes, como uso de medicamentos e exercícios, uma vez que exercícios suaves produzem leve diminuição na concentração de colesterol e triglicérides no soro, que pode persistir por vários dias, (BURTIS, 2001).

Coleta de dados

Os indivíduos participantes foram submetidos à coleta de sangue duas vezes por semana, durante quatro semanas consecutivas, pela manhã em jejum.

As coletas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínica Hess LTDA, localizado no município de Luis Alves -SC, em pacientes voluntários conterrâneos. As análises foram incluídas na rotina diária do laboratório.

As determinações de Colesterol total, triglicerídeos e HDL colesterol foram realizadas utilizando Kits comerciais adquiridos para o projeto, da marca Gold Analisa®. Os kits baseiam-se na formação de soluções coloridas cuja intensidade de cor é proporcional à concentração do analito a ser dosado. As absorvâncias serão determinadas no Analisador Bioquímico semi-automático Thermo Plate (Analyzer®), disponível no laboratório onde serão realizadas as análises. O valor de LDL-c (LDL-colesterol) será calculado através da fórmula de Friedwald:

$$\text{LDL-c} = \text{CT} - (\text{HDL-c} + \text{TG}/5)$$

A análise dos dados foi realizada através da determinação da variabilidade analítica e da variabilidade biológica. A variabilidade analítica (coeficiente de variação analítica) será determinada através de ensaio de repetição da mesma amostra normal em 10 corridas independentes nas mesmas condições experimentais das amostras.

A variabilidade biológica intra-individual e interindividual foi determinada pela fórmula:

$$CV_i = (CV_T)^2 - (CV_A)^2$$

sendo o coeficiente de variação total (CV_T) representado pela soma das variações biológicas intra-individuais (CV_i) e analíticas (CV_A) envolvidas no processo.

Para a determinação da variabilidade intra-individual foram utilizados somente os dados (média, desvio padrão e coeficiente de variação) do paciente em estudo e para a determinação da variabilidade média foram utilizados dados obtidos de todos os participantes do trabalho.

A variabilidade analítica foi determinada através de análise de soro controle obtido do Programa Nacional de Controle de Qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, reconstituído mensalmente para este fim.

Aspectos éticos

Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVALI. Os pacientes foram previamente informados sobre o objetivo do projeto, participando voluntariamente mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

No término do projeto os pacientes receberam os laudos contendo os resultados das análises.

RESULTADOS

A variação analítica foi determinada através do soro controle, dosadas juntamente com as amostras coletadas dos idosos. Os resultados (Tabela I) demonstram valores não significativamente acima do recomendado, sendo o colesterol HDL o que se encontra com valor de Cva bastante abaixo do esperado. Esta relação já era esperada uma vez que os equipamentos utilizados não foram os automatizados, encontrando-se uma variação maior.

O valor Cva de LDL-colesterol (6,16 %) obtido foi com maior diferença do recomendado, porém este resultado é satisfatório uma vez que laboratórios utilizando a metodologia adequada encontram valores entre 2,7 a 6,8%, (ZIMATH *et al.*, 2007).

Da população estudada, 6 idosos não faziam uso de nenhum tipo de medicação. Os 12 restantes utilizavam anti-hipertensivos (8), medicamentos para tratamento de hipotireoidismo (3), dislipidemias e/ou risco coronariano (3), diabetes (1), artrite (1), osteoporose (1), antidepressivo (1). Destes, 10 utilizavam mais de um medicamento simultaneamente.

Os valores obtidos nas determinações de cada um dos indivíduos foram plotados em gráficos conforme apresentado nas figuras I, II, III, e IV. Estas figuras mostram a variação dos resultados do mesmo paciente no período do estudo. A análise numérica destes dados pode ser observada nas tabelas seguintes.

Os valores de variabilidade biológica individual estão listados na tabela II. Os indivíduos 1 a 8 são do sexo feminino e de 9 a 16 do sexo masculino. Pode-se perceber nos valores destacados em negrito que 7 dos 16 pacientes estudados apresentaram algum dos parâmetros com variabilidade biológica intra-individual superior à mediana da literatura. Destes, 4 (57%) não utiliza qualquer tipo de medicação.

Comparando-se os dados obtidos neste trabalho com pesquisa anterior que analisou os mesmos parâmetros em indivíduos jovens, observou-se valores de variabilidade biológica média bem menor nos idosos em todos os itens analisados (tabela III). Observou-se ainda que a diferença que existia entre a variabilidade de homens e mulheres

(sempre maior nos homens) jovens, desaparece nos idosos, (ZIMATH *et al.*, 2007). Chama atenção o fato de que nenhum dos valores de variabilidade biológica média foi maior que a mediana dos estudos previamente realizados. Na tabela IV, pode-se verificar a comparação dos dados de variabilidade biológica média, comparando-se o grupo de pacientes que tomava medicamentos e o grupo que não fazia uso de qualquer medicação. Os resultados indicam claramente um aumento na variabilidade entre os indivíduos que não faziam uso de medicamentos. Se inferirmos que a variabilidade biológica reflete numericamente a instabilidade metabólica a que o organismo está sujeito, os resultados indicam que o uso de medicamentos parece reduzir esta instabilidade, tornando o organismo mais "previsível" aos exames laboratoriais.

Observando este mesmo tipo de comparação, agora agrupando somente os pacientes que fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos, observa-se que a redução da variabilidade permanece. Apenas 25% indivíduos que fazem uso de anti-hipertensivos apresentaram parâmetros com variabilidades biológicas aumentadas, enquanto que no grupo que não ingere medicamentos, 66% apresentaram pelo menos um valor elevado.

A literatura tem apontado para a necessidade de realização de estudos desta natureza a fim de identificar os intervalos necessário para a determinação de parâmetros lipídicos em pacientes em tratamento com drogas hipolipemiantes. Resultados apontam para um aumento da variabilidade biológica nos resultados de colesterol conforme o aumento do intervalo entre as coletas; apontando 7% para intervalos de 1 ano, 2-3% para intervalos de 24 horas e 4-5% para intervalos de 4 semanas, (GLASZLOU *et al.*, 2008). Tendo em vista a duração do presente estudo, os resultados obtidos são compatíveis aos previamente descritos, (tabela IV e V). Em termos práticos, estes números apontam para o cuidado que é necessário ter no acompanhamento dos pacientes que iniciam um determinado tratamento, seja dietético ou medicamentoso, para doenças crônicas. Ao comparar o resultado de dois exames, além do número apresentado como valor obtido, faz-se necessário considerar o tempo de intervalo entre as duas determinações e ter um conhecimento prévio da magnitude da variabilidade biológica que pode estar embutida na diferença do resultado. Alguns fatores causadores desta variabilidade já são conhecidos e outros estão em estudo. No caso do colesterol, sabe-se que atividade física, stress psicológico, doença aguda e consumo de álcool afetam de forma significativa os níveis individuais. Fatores genéticos específicos vêm sendo também estudados e correlacionados com a variabilidade intra-individual, apontando para possibilidades mais complexas de abordagem do tema, (PEREIRA *et al.*, 2004).

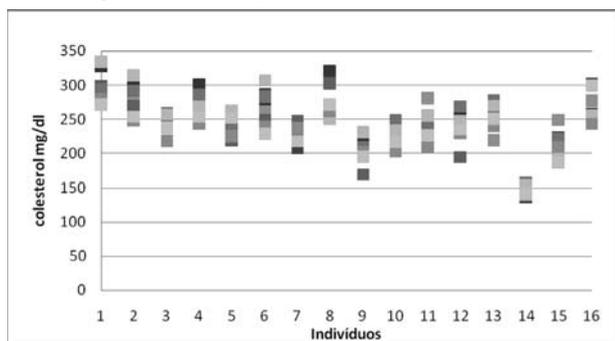


Figura I- Distribuição dos valores de colesterol obtidos, nas determinações de cada indivíduo. Cada ponto representa um valor obtido na dosagem.

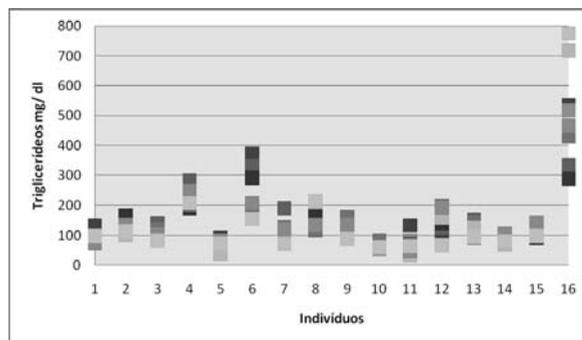


Figura II- Distribuição dos valores de triglicerídeos obtidos, nas determinações de cada indivíduo. Cada ponto representa um valor obtido na dosagem.

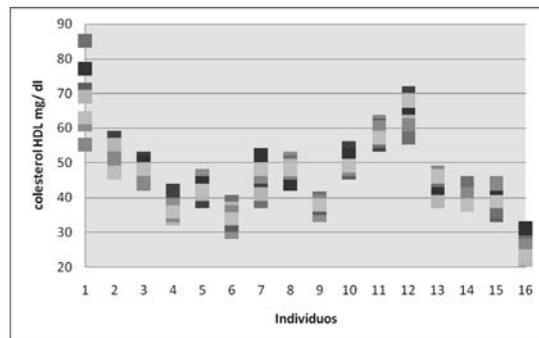


Figura III- Distribuição dos valores de HDL-colesterol total obtidos, nas determinações de cada indivíduo. Cada ponto representa um valor obtido na dosagem.

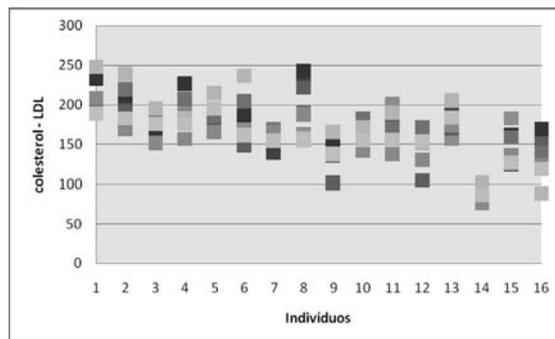


Figura IV- Distribuição dos valores de LDL-colesterol total obtidos, nas determinações de cada indivíduo. Cada ponto representa um valor obtido na dosagem.

TABELA I
Coeficiente da variação analítica do perfil lipídico

Análito	Cva desejado	Cva obtido	Método recomendado
Colesterol total	< 3	3,55	Enzimático
HDL-colesterol	< 6	3,10	Enzimático
LDL-colesterol	< 4	6,16	Equação de Friedwald
Triglicerídeos	< 5	7,20	Enzimático

TABELA II
Variabilidade biológica intra-individual

Variabilidade Biológica Intra-individual (CVb)				
	Colesterol total (1,7- 11,6)*	Triglicérides (5,3-74)*	LDL-colesterol (2-15,3)*	HDL-colesterol (2,2-13,7) *
	6,1**	22,6**	9,5**	7,4**
1	3,92	15,07	3,42	11,35
2	4,5	11,52	4,61	3,79
3	1,76	16,08	1,56	2,73
4	3,74	6,88	5,02	3,76
5	2,58	20,96	2,55	1,92
6	10,09	26,25	9,79	5,05
7	1,92	26,91	0	6,15
8	6,41	18,39	11,94	1,44
9	5,78	10,69	7,95	1,67
10	2,99	18,18	2,4	1,6
11	5,14	35,83	5,2	1,17
12	5,77	23,7	8,29	3,42
13	3,85	13,98	2,88	3,04
14	1,72	7,34	3,27	1,47
15	7,37	9,15	8,74	4,8
16	4,99	26,2	13,4	9,7

*Intervalo de variação ** coeficiente de variação biológico médio

TABELA III
Variabilidade biológica média

Variabilidade Biológica média				
	Colesterol total (1,7- 11,6)*	Triglicérides (5,3-74)*	LDL-colesterol (2-15,3)*	HDL-colesterol (2,2-13,7) *
	6,1**	22,6**	9,5**	7,4**
Total	4,53±2,25	17,94±8,21	6,07±3,89	3,94±2,96
Homens	4,70±1,78	18,13±9,84	6,51±3,77	3,35±2,84
Mulheres	4,36±2,76	17,75±6,90	5,62±4,07	4,52±3,16

*Intervalo de variação ** coeficiente de variação biológico médio

TABELA IV
Variabilidade biológica média levando em consideração o uso de medicamentos

Variabilidade Biológica média				
	Colesterol total (1,7- 11,6)*	Triglicérides (5,3-74)*	LDL-colesterol (2-15,3)*	HDL-colesterol (2,2-13,7) *
	6,1**	22,6**	9,5**	7,4**
Total	4,53±2,25	17,94±8,21	6,07±3,89	3,94±2,96
Pacientes que não tomam medicamentos (n=6)	5,01±1,0	22,19±8,20	7,52±4,43	5,02±4,38
Pacientes que tomam medicamentos (n=12)	4,24±2,76	15,39±7,47	4,58±3,27	3,29±1,66

*Intervalo de variação ** coeficiente de variação biológico médio

TABELA V
Variabilidade biológica média levando em consideração a classe do medicamentos

Variabilidade Biológica média em relação a anti-hipertensivos				
	Colesterol total (1,7- 11,6)*	Triglicérides (5,3-74)*	LDL-colesterol (2-15,3)*	HDL-colesterol (2,2-13,7) *
	6,1**	22,6**	9,5**	7,4**
Total	4,04±1,76	17,87±8,28	5,23±3,94	4,02±3,11
Pacientes que não tomam medicamentos (n=6)	5,01±1,00	22,19±8,20	7,52±4,43	5,02±4,38
Pacientes que tomam Antihipertensivos (n=8)	3,32±1,91	14,62±7,15	3,51±2,65	3,27±1,65

*Intervalo de variação ** coeficiente de variação biológico médio

CONCLUSÃO

Os dados encontrados neste trabalho mostram que, na população idosa estudada, o uso de medicamentos reduziu a variabilidade biológica na determinação de parâmetros lipídicos séricos. Não era o objetivo aqui avaliar o efeito de qualquer tipo de tratamento ou intervenção nos pacientes, apenas quantificar a variabilidade nos resultados que apre-

sentam. A aplicação clínica destes dados dá-se no sentido de mostrar que o uso de medicamentos não afeta de forma a incrementar a variabilidade e que a interpretação dos resultados de pacientes em tratamento com um ou vários medicamentos de uso contínuo deve seguir os mesmos cuidados de indivíduos que não fazem uso de medicação, ou seja, em determinações independentes, antes de atribuir aumento ou diminuição do analito a fatores externos, considerar a existência da variabilidade biológica.

AGRADECIMENTOS

Laboratório de Análises Clínicas Hess pelo espaço de realização dos exames e recrutamento dos pacientes.

FINANCIAMENTO

Artigo 170/SC - UNIVALI

REFERÊNCIAS

- BURTIS, C. A. ; ASHWOOD, E. R. Tietz. Fundamentos de química clínica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 836 p.
- GIANINI, S.D. Dislipidemias. São Paulo: BG Cultural, 1998. 158 p.
- HAYASHI T.; KAWASHIMA S.; ITOH H.; YAMADA N.; SONE H., WATANABE H.; HATTORI Y.; OHROI T.; YOSHIZUMI M.; YOKOTE K.; KUBOTA K.; NOMURA H.; UMEGAKI H.; IGUCHI A.; Japan CDM group .Importance of lipid levels in elderly diabetic individuals: baseline characteristics and 1-year survey of cardiovascular events. Circulation Journal., 7(2): 218-225, 2008.
- HEMPE, J.M.; GOMEZ, R.; CHALEW, S.A. Biological variation in HbA1c predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes. Diabetes Care., 27(6): 1259-1264, 2004.
- IV Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivo Brasileiro de Cardiologia., 88:1-19, 2007.
- MCCARTER, R.J.; HEMPE, J.M., GOMEZ, R., CHALEW, S.A. Biological variation in HbA1c predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes. Diabetes Care., 27(6): 1259-1264, 2004.
- MCCARTER, R.J.; HEMPE, J.M.; CHALEW, S.A. Mean blood glucose and biological variation have greater influence on HbA1c levels than glucose instability: an analysis of data from the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care., 2(2): 352-355, 2006.
- ENGROFF, P.; ARAÚJO, P. L.; SAGNAOLIN, V.; SCHOETER, G.; FAGGIANI, F.T.; GOMES, I.;SCHNEIDER, R.H.; TERRA, N.L.;MORRONE, F. B.; CARLI, G.A. Efeitos dos medicamentos hipolipêmicos no perfil lipídico de população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil. RBAC.,40(4):297-300, 2008.
- GLASZLOU, P.P.; IRWIG, L.;HERTLER, S.; SIMES, J.R.;TONKIN, A. Monitoring cholesterol levels: measurement error or true change? Ann Intern Med., 148: 656-661, 2008.
- ROMALDINI, C. C.; ISSLER, H. ; CARDOSO, A. L. ; DIAMENT, J. ; FORTI, N. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial prematura. Jornal de Pediatria., 80(2):135-140, 2004.
- PEREIRA, M.A.; WEGGEMANS, R.M.; JACOBS, D.R.;HANNAN, P.J.; ZOCK, P.L.; ORDOVAS, J.M.; KATAN, M. B. Within-person variation in serum lipids: implications for clinical trials. International Journal of Epidemiology.,33(3): 534-541,2004.
- SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. Atualização brasileira sobre diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. 144p.
- SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivo Brasileiro de Cardiologia., 77: 9-10, 2001.
- V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Arquivos Brasileiros de Cardiologia., 89(3),8-12, 2007 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-1501-2007-0003-0008>
- ZIMATH, T.; PINOTTI, P.; GONÇALVES, J. B. P.; PERSUHN, D. C.Variabilidade biológica nas concentrações de lipídeos séricos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.,41(4):467-473 , 2007.
- WARNICK, G.R.; RIFAI, N. Quality specifications and the assessment of the biochemical risk of atherosclerosis. Clin Chin Acta.,346: 55-64, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Darlene Camati Persuhn
Universidade do Vale do Itajaí
Rua Uruguai, 458
Bloco 27, térreo, Direção do CCS
CEP: 88.302-202 Itajaí – SC

Prevalência de anemia nas gestantes atendidas no Sistema Único de Saúde – Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de Belo Horizonte

Prevalence of anemia in pregnant women assisted by the Sistema Único de Saúde - Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura de Belo Horizonte

Margarita Elizabeth Lafuente TAPIA¹, Maria Lúcia Silva FALEIRO¹, Maria de Lourdes Baêta Zille GONTIJO¹, Catharine Souza MARTINS², Karina Augusta VIANA², Luci Maria Sant'Ana DUSSE² & Maria das Graças CARVALHO²

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo investigar as alterações nos eritogramas de mulheres gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Foram avaliados de outubro de 2007 a agosto de 2008 os eritogramas de 1448 mulheres gestantes distribuídas em três grupos de acordo com a idade: até 18 anos; mulheres entre 19-35 anos e mulheres acima de 35 anos. Os dados foram coletados nos cinco laboratórios distritais que atendem aos 147 centros de saúde distribuídos nos nove distritos sanitários da Prefeitura de Belo Horizonte. Dentre as mulheres grávidas estudadas na rede pública municipal de Belo Horizonte, 8,29% apresentaram-se com anemia, com maior incidência dessa condição nos distritos sanitários Leste e Nordeste. A maior incidência de anemia ocorreu entre as adolescentes menores de 18 anos, enquanto a anemia normocítica e normocrômica foi a mais prevalente em todos os distritos sanitários. A maior ocorrência de anemia em gestantes adolescentes pode ser explicada não só pelos aspectos sócio-econômicos e culturais como também pela maior necessidade de ferro para atender as demandas do crescimento próprias da idade. Após análise dos dados, torna-se pertinente considerar a necessidade de reforçar programas educacionais enfatizando riscos e problemas que podem ocorrer durante a gravidez, principalmente na adolescência, já que as gestantes nessa faixa etária são mais susceptível à anemia.

PALAVRAS-CHAVE - Anemia, Gravidez, SUS

SUMMARY - The present study has as aim to investigate alterations in red blood cells tests carried out in pregnant women assisted by SUS/Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. From October 2007 to August 2008, red blood cells tests from pregnant women were assessed and distributed into three groups according to the age: below 18 years, women between 19-35 years and women above 35 years old. Data were collected in five regional laboratories that assist 147 health units distributed into nine sanitary regions belonging to Prefeitura de Belo Horizonte. Among pregnant women studied, 8,29% presented anemia, with a higher incidence in east and northeast sanitary regions. The greatest incidence of anemia occurred in teenagers below 18 years old. Normocytic and normochromic anemia was the most prevalent in all sanitary regions. The highest anemia rate in pregnant teenagers may be explained not only by social-economic and cultural aspects but also by a great demand for iron due to growth. All data taken together suggest the need of strengthening educational strategies, and focusing risks and problems during pregnancy, mainly in teenagers, once that pregnant women in this age is more susceptible to anemia development.

KEYWORDS - Anemia, Pregnancy, SUS

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a anemia é a condição em que os níveis de hemoglobina estão abaixo dos valores normais, estabelecidos para grupos específicos, resultando em menor capacidade das hemácias em transportar oxigênio (WHO¹¹).

Nas formas mais graves, a anemia está associada à fadiga, cansaço, tontura, sonolência. Crianças e mulheres grávidas são particularmente vulneráveis à anemia associada à deficiência de ferro. (WHO¹¹).

O grupo de mulheres no ciclo grávido-puerperal ainda hoje expressa altos índices de anemia, mesmo após as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) de suplementação universal nesse contingente populacional. Há evidências de que a anemia no ciclo gestatório, especialmente por carência de ferro, pode estar associada a aumento de mortalidade materna e perinatal, prematuridade, baixo peso ao nascer e morbidade do infante (BRESANI¹). Não são apenas os valores de hemoglobina que definem se um indivíduo é ou não anêmico, ou se há ou não deficiência nutricional. O que pode ser normal para um indivíduo pode não ser para outro. Segundo a OMS, os valores de hemoglobina que definem anemia em mulheres estão abaixo de 12,0g/dL;

porém em gestantes, estão abaixo de 11,0g/dL e devem ser interpretados à luz dos achados clínicos (SANTOS³).

Não há, portanto, consenso na definição dessa doença na gestação. Mesmo do ponto de vista laboratorial, os pontos de corte adotados para a hemoglobina são variáveis. Alguns autores levam em consideração a fisiologia da gravidez, considerando os mais baixos (10,0 a 10,5g/dL) para o segundo trimestre, tendo em vista a hemodiluição desse período (BRESANI¹).

A gestação é um estado que apresenta características hematológicas especiais e, entre essas se destaca o aumento do volume sangüíneo, a partir do primeiro trimestre da gestação. O volume do plasma aumenta em torno de 45 a 50%, comparado com o aumento de 15 a 20% das células sangüíneas. Este é um processo desigual considerando que o plasma aumenta em torno de três vezes mais que o número total de hemácias, leucócitos e plaquetas. Por esse motivo existirá uma hemodiluição que interfere nos resultados do eritograma, sendo responsável pela anemia fisiológica da gestação (NASCIMENTO³).

Nem todas as mudanças que ocorrem no sangue durante a gravidez podem ser explicadas pela hemodiluição, pois os níveis de ferro sérico diminuem, enquanto os valores para protoporfirina eritrocitária livre e a capacidade de ligação do ferro latente aumentam (LEAVELL⁴). Do ponto de vista

Recebido em 15/04/2009

Aprovado em 25/08/2010

¹Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia/UFMG

nutricional, a anemia por deficiência de ferro é a causa mais comum deste distúrbio durante a gravidez, considerando que a mulher grávida precisa de maior aporte de ferro para suprir as suas necessidades e as do feto.

Se a gravidez ocorre na adolescência, há demanda do organismo ainda jovem pelo ferro, em função do crescimento corpóreo característico dessa idade, acrescida àquela relacionada ao processo gestacional. Estes fatores combinados aumentam de forma substancial o risco da instalação de deficiências nutricionais, com sérias conseqüências, principalmente nas classes sociais menos favorecidas, cujo consumo de alimentos, na maioria das vezes, é inadequado (FUJIMORI⁵).

A mortalidade materna é um dos principais problemas de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde o risco de vida da mãe, seja na gravidez ou durante o parto, é 50-100 vezes maior do que nos países desenvolvidos (PIZARRO⁶). A influência da anemia sobre a gravidez tem sido amplamente discutida há muitos anos. (PIZARRO⁶). Desse modo, observa-se a necessidade de um acompanhamento preventivo visando evitar a ocorrência da anemia na gravidez. Dentre as medidas cabíveis, encontra-se um suporte nutricional às grávidas e, de forma mais pontual ainda, envolve questões sociais. O combate à pobreza e às enormes diferenças sociais ajudariam a manter melhor estado nutricional não só de mulheres grávidas como de toda a população.

A deficiência grave de ferro é bastante evidente, pois causa importante anemia microcítica e hipocrômica. Porém, um grau mais leve de deficiência desse elemento pode estar associado a mudanças menos significativas nos índices hematimétricos e na morfologia dos eritrócitos (ZAGO¹⁰). A microcitose é considerada quando o índice do Volume Corpuscular Médio (VCM) da hemácia é menor que 80 μ^3 , enquanto a hipocromia é considerada quando o índice de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) for menor que 27pg (CARVALHO & SILVA³).

Além da deficiência de ferro, as gestantes são propensas a desenvolver deficiência de folato, provavelmente devido ao aumento da demanda desse nutriente para o crescimento fetal e tecidos maternos. Outros fatores que contribuem para deficiência de folato são a dieta inadequada, hemodiluição fisiológica e gestacional, influências hormonais e uso de medicamentos (SANTOS⁷).

Por razões desconhecidas, mulheres podem desenvolver anemia aplástica durante a gravidez tendo, em geral, resolução espontânea ao término desta, podendo recorrer em novas gestações. A associação com gravidez é rara, estando relacionada com alta morbidade e mortalidade materna e fetal (TELES⁹). O presente estudo teve como objetivo investigar as alterações detectadas nos eritogramas de mulheres gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, enfocando a prevalência de anemia. A identificação do tipo de anemia mais freqüente por Distrito Sanitário do município e a caracterização da população de gestantes anêmicas foram, também, investigadas. Acredita-se que os achados poderão subsidiar a definição de estratégias mais dirigidas para tentar equacionar os possíveis efeitos negativos conseqüentes à anemia, em mulheres grávidas e no feto, repercutindo favoravelmente na melhoria da qualidade de vida de ambos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados, retrospectivamente (de outubro de 2007 a agosto de 2008), os eritogramas de 1448 mulheres gestantes de diferentes faixas etárias, distribuídas em três grupos: jovens adolescentes até 18 anos; mulheres entre 19 e 35 anos

e mulheres acima de 35 anos. Os dados foram coletados nos cinco Laboratórios Distritais que atendem aos 147 centros de saúde distribuídos nos nove distritos sanitários da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte: Laboratório Distrital Centro Sul/Pampulha (LDCS/P), Laboratório Distrital Leste/Nordeste (LDLE/NE), Laboratório Distrital Norte/Venda Nova (LDN/VN), Laboratório Distrital Oeste/Barreiro (LDO/B) e Laboratório Distrital Noroeste (LDNO). O banco de dados utilizado foi o Sistema de Laboratório de Patologia Clínica (SLPC) dos Laboratórios Distritais da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (SMSA/PBH). Os resultados dos eritogramas foram obtidos mediante análise do sangue recém coletado em EDTA K3 e processado no equipamento CELL DYN 3700. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: dosagem de Hemoglobina, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM). Foram consideradas como anêmicas as mulheres grávidas com valor de hemoglobina inferior a 11g/dL, conforme preconizado pela OMS. As hemácias foram consideradas microcíticas e hipocrômicas quando os índices de VCM e HCM foram menores que 80 μ^3 e 27pg, respectivamente. Quando o VCM se encontrava entre 80 μ^3 e 96 μ^3 considerou-se as hemácias como normocíticas e acima de 96 μ^3 , macrocíticas. Nos resultados com índice de HCM na faixa de 27pg a 32pg, as hemácias foram classificadas como normocrômicas. No tratamento estatístico dos resultados foi utilizado o Sigma Stat, versão 2.03. O teste ANOVA foi utilizado para comparar as médias dos grupos e o teste de Tukey ou Dunn para localizar a diferença entre os grupos analisados, enquanto o teste de Kruskal-wallis foi utilizado para comparar as medianas dos grupos. Nesse estudo também foi investigada a presença de correlação entre a idade e o desenvolvimento de anemia pelo teste de Pearson. Foram considerados como significativos os valores de p inferior a 0,05.

RESULTADOS

Dentre as mulheres grávidas estudadas na rede pública municipal de Belo Horizonte, 8,29% apresentaram-se com anemia, ou seja, Hemoglobina inferior a 11g/dL (Tabela 1), sendo que a maior incidência desta condição ocorreu nos Distritos Sanitários Leste e Nordeste, seguidos dos Distritos Sanitários Norte e Venda Nova. Nos Distritos Sanitários Leste e Nordeste, 13,92% das mulheres grávidas atendidas apresentaram anemia, enquanto que nos Distritos Sanitários Norte e Venda Nova a porcentagem de mulheres grávidas anêmicas foi de 10,53% (Tabela 1).

TABELA I
Distribuição das mulheres grávidas atendidas nos laboratórios distritais da SMSA/PBH, de Outubro/2007 a Agosto/2008 quanto à presença de anemia (HB<11 ou HB≥11)

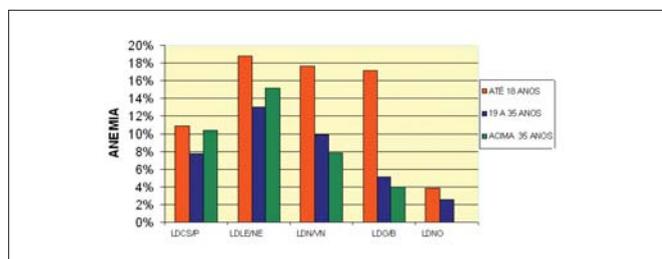
LABORATÓRIOS	Anêmicas (HB<11g/dL)	Não Anêmicas (HB≥11g/dL)	TOTAL
LDCS/P	26 (8,36%)	285 (91,64%)	311 (100%)
LDLE/NE	38 (13,92%)	235 (86,08%)	273 (100%)
LDN/VN	32 (10,53%)	272 (89,47%)	304 (100%)
LDO/B	17 (6,51%)	244 (93,49%)	261 (100%)
LDNO	7 (2,34%)	292 (97,66%)	299 (100%)
TOTAL:	120 (8,29%)	1328 (91,71%)	1448 (100%)

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte

Considerando a faixa etária, a maior incidência de anemia ocorreu entre as adolescentes menores de 18 anos, ou seja, 14,02% (Tabela 2), enquanto a menor incidência, 6,95%, ocorreu em mulheres gestantes com idade superior a 35 anos. A distribuição dos casos de anemia em porcentagem por faixa etária e por laboratório distrital pode ser observada na Figura 3.

TABELA II
Caracterização das mulheres grávidas atendidas nos laboratórios distritais da SMSA/PBH, de Outubro/2007 a Agosto/2008, quanto à idade e ao perfil hemoglobínico (HB<11 ou HB≥11)

LABORATÓRIOS	IDADE até 18 ANOS		IDADE 19-35 ANOS		IDADE >35ANOS	
	HB<11g/dL	HB≥11g/dL	HB<11g/dL	HB≥11g/dL	HB<11g/dL	HB≥11g/dL
LDCS/P	4 (10,81%)	33 (89,19%)	19 (7,76%)	226 (92,24%)	3 (10,34%)	26 (89,66%)
LDLE/NE	6 (18,75%)	26 (81,25%)	27 (12,98%)	181 (87,02%)	5 (15,15%)	28 (84,85%)
LDN/VN	6 (17,65%)	28 (82,35%)	23 (9,91%)	209 (90,09%)	3 (7,89%)	35 (92,11%)
LDO/B	6 (17,14%)	29 (82,86%)	9 (5,11%)	167 (94,89%)	2 (4,00%)	48 (96%)
LDNO	1 (3,85%)	25 (96,15%)	6 (2,54%)	230 (97,46%)	0 (0,00%)	37 (100,00%)
TOTAL	23 (14,02%)	141 (85,98%)	84 (7,66%)	1013 (92,34%)	13 (6,95%)	174 (93,05%)



Fonte: SUS/PBH = Sistema Único de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; LDCS/P = Laboratório Distrital Centro Sul/ Pampulha; LDLE/NE = Laboratório Distrital Leste/Nordeste; LDN/VN = Laboratório Distrital Norte/Venda Nova; LDO/B = Laboratório Distrital Oeste/Barreiro; LDNO = Laboratório Distrital Noroeste

Figura 1 – Casos de anemia (%) em mulheres grávidas, por faixa etária e por laboratório distrital, atendidas pelo SUS/BH, de Outubro/2007 a Agosto/2008

Em cada Distrito Sanitário correlacionou-se as faixas etárias entre si de acordo com o perfil hemoglobínico. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de hemoglobina encontrados para gestantes menores de 18 anos e maiores que 35 anos para quatro Distritos Sanitários: Centro Sul, Pampulha, Leste e Nordeste (Tabela 3). Considerando todas as gestantes atendidas na SMSA/PBH, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de hemoglobina para mulheres de 19-35 anos e maiores que 35 anos em relação às mulheres até 18 anos; e também entre a faixa etária de 19-35 anos e maiores que 35 anos (Tabela 4).

TABELA III
Concentração de hemoglobina (g/dL), expressa como média e desvio padrão, em mulheres grávidas ($\mu \pm DP$) atendidas em cada Laboratório Distrital da PBH, de acordo com a faixa etária

LABORATÓRIO	FAIXA ETÁRIA		
	até 18 ANOS	19-35 ANOS	>35 ANOS
LDLE/NE	11,70 \pm 0,92	12,10 \pm 1,04	12,43 \pm 1,11*
LDN/VN	12,00 \pm 1,16	12,31 \pm 1,11	12,47 \pm 1,01
LDO/B	12,42 \pm 1,31	12,61 \pm 0,98	12,91 \pm 1,06
LDNO	12,59 \pm 1,09	12,73 \pm 1,02	12,96 \pm 1,00

Fonte: PBH = Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (*vs 18 anos)

TABELA IV
Concentração de hemoglobina (g/dL) em mulheres grávidas, expressa em mediana e diferença interquartilica (DI), atendidas de Outubro/07 a Agosto/08, nos laboratórios distritais da SMSA/PBH de acordo com a faixa etária

Faixa etária (n)	Mediana (Diferença Interquartilica)
Até 18 anos (164)	12,2 (11,3 2,9)
19-35 anos (1097)	12,5 (11,7 3,1)*
>35 anos (187)	12,8 (12,1 3,4)**

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre grupos para $p < 0,05$ (* vs até 18 anos, **vs 19-35 anos)

Avaliou-se os valores de hemoglobina das gestantes atendidas em cada Laboratório Distrital, e correlacionou-se os resultados entre si. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre alguns Distritos Sanitários, principalmente em relação aos Distritos Sanitários Leste e Nordeste (Tabela 5).

TABELA V
Concentração de hemoglobina (g/dL) em mulheres grávidas, atendidas nos laboratórios distritais da SMSA/PBH de Outubro/07 a Agosto/08

LABORATÓRIOS (n)	MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO
LDCS/P (311)	12,47 \pm 1,18 *
LDLE/NE (273)	12,09 \pm 1,04
LDN/VN (304)	12,30 \pm 1,10
LDO/B (261)	12,64 \pm 1,05 * **
LDNO (299)	12,75 \pm 1,02 * ** ***

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre grupos para $p < 0,05$ (* vs até 18 anos, **vs 19-35 anos)

Analisando os índices hematimétricos observou-se que 25,8% das gestantes anêmicas apresentaram anemia microcítica e hipocrômica, 73,4% anemia normocítica e normocrômica e 0,8% macrocítica e normocrômica (Tabela 6). Com relação à anemia microcítica e hipocrômica, a maior incidência ocorreu nos Distritos Sanitários Oeste e Barreiro. Nesses Distritos, 47% dos casos de anemia eram microcítica e hipocrômica (Tabela 6). As gestantes com mais de 35 anos foram as que tiveram maior porcentagem de microcitose e hipocromia (30,8%). A análise dos dados, tanto de acordo com a faixa etária, quanto por Distritos Sanitários, demonstra predominância de anemia normocítica e normocrômica (Tabela 7)

TABELA VI
Caracterização das mulheres grávidas atendidas nos Laboratórios Distritais da SMSA/ PBH, de Outubro/2007 a Agosto/2008, quanto aos índices hematimétricos VCM (Volume Corpúscular Médio) e HCM (Hemoglobina Corpúscular Média)

LABORATÓRIOS	MCV<80 μ MCH<27 pg	MCV >80 μ MCH >27 μ pg	MCV>96 μ MCH>32 pg	TOTAL
LDCS/P	8 (30,8%)	18 (69,2%)	0 (0%)	26(100%)
LDLE/NE	7 (18,4%)	31 (81,6%)	0 (0%)	38 (100%)
LDN/VN	5 (15,6%)	26 (81,2%)	1 (3,2%)	32 (100%)
LDO/B	8 (47%)	9 (53%)	0 (0%)	17 (100%)
LDNO	3 (42,8%)	4 (57,2%)	0 (0%)	7 (100%)
TOTAL	31 (25,8%)	88 (73,4%)	1 (0,8%)	120 (100%)

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte

TABELA VII
Número e percentual de mulheres grávidas anêmicas dos Distritos Sanitários da SMSA/PBH quanto à idade e aos índices hematimétricos VCM (Volume Corpúscular Médio) e HCM (Hemoglobina Corpúscular Média)

Laboratório	até 18 anos			19-35 anos			>35 anos		
	Anemia M/H	Anemia N/N	Anemia M/N	Anemia M/H	Anemia N/N	Anemia M/N	Anemia M/H	Anemia N/N	Anemia M/N
LDCS/P	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0 (0%)	5 (26,3%)	14 (73,7%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
LDLE/NE	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0%	5 (18,5%)	22 (81,5%)	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)
LDN/VN	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	4 (17,4%)	19 (82,6%)	0 (0%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)
LDO/B	2(33,3%)	4 (66,7%)	0 (0%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
LDNO	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	7(30,4%)	16(69,6%)	0 (0%)	20 (23,8%)	64 (76,2%)	0 (0%)	4 (30,8%)	8 (61,5%)	1 (7,7%)

Fonte:SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; M/H = Microcítica / Hipocrômica; N/N = Normocítica/ Normocrômica; M/N = Macrocítica/Normocrômica

Considerando todas as gestantes atendidas pelos laboratórios distritais da SMSA/PBH, houve diferença estatisticamente significativa para os valores médios de VCM e HCM para gestantes até 18 anos e de 19-35 anos em relação às gestantes com faixa etária maior que 35 anos (Tabela 8 e 9).

TABELA VIII
Volume Corpuscular Médio (VCM) em l3, expresso em mediana e diferença interquartilica (DI), das mulheres grávidas atendidas nos laboratórios distritais da SMSA/PBH, de Outubro/2007 a Agosto/2008, de acordo com a faixa etária

Faixa etária (n)	Mediana (Diferença Interquartilica)
Até 18 anos (164)	86,5 (83,5-89,2)
19-35 anos (1097)	87,4 (84,0-90,3)
>35 anos (187)	88,7 (84,5-91,8) * **

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre grupos para p<0,05 (* vs até 18 anos, **vs 19-35 anos)

TABELA IX
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) em pg, expressa em mediana e diferença interquartilica (DI), de mulheres grávidas atendidas nos laboratórios distritais da SMSA/PBH de Outubro/07 a Agosto/08, de acordo com a faixa etária

Faixa etária (n)	Mediana (Diferença Interquartilica)
Até 18 anos (164)	29,10 (27,8-30,2)
19-35 anos (1097)	29,30 (28,1-30,5)
>35 anos (187)	29,90 (28,1-30,9) * **

Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre grupos para p<0,05 (* vs até 18 anos, **vs 19-35 anos) Fonte: SMSA/PBH = Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte; Diferença significativa entre grupos para p<0,05 (* vs até 18 anos, **vs 19-35 anos)

Não foi observada correlação entre a idade e o desenvolvimento de qualquer tipo de anemia de acordo com o teste de Pearson.

DISCUSSÃO

O presente estudo enfocou a prevalência de anemia em mulheres grávidas atendidas na SMSA/PBH. Os resultados dos eritogramas obtidos nos laboratórios distritais indicaram um percentual de 8,29% de casos de anemia na população alvo do estudo. No entanto, o maior número de casos ocorreu nas regiões leste e nordeste da capital. Porém, para explicar esse achado seria necessário correlacionar os dados obtidos nesse estudo com outros estudos similares, enfocando aspectos socio-econômicos e culturais. Todavia, cumpre ressaltar que a região Nordeste é considerada uma das mais carentes do município de Belo Horizonte.

Quando se analisou os casos de anemia por faixa etária, observou-se maior ocorrência em gestantes adolescentes (abaixo de 18 anos), o que pode se explicar não só pelos aspectos sócio-econômicos e culturais como também pela maior necessidade de ferro para atender as demandas do crescimento próprias da idade.

Conforme mostram os resultados, o tipo mais prevalente de anemia, considerando todos os distritos sanitários, foi a anemia normocítica e normocrômica. Como é sabido, essa anemia está frequentemente associada a processos infecciosos e/ou inflamatórios, pois nestas condições pode ocorrer uma diminuição da eritropoese por citocinas produzidas em função de tais processos, facilitando a instalação da anemia. Cumpre ressaltar que a precariedade de condições econômicas e culturais vem favorecer a ocorrência de infecções e outras doenças. Outro aspecto a ser enfatizado para justificar, pelo menos em parte, a maior ocorrência de anemia normocítica e normocrômica em mulheres grávidas consiste na deficiência concomitante de ferro e folatos. Sabe-se que a deficiência de folatos é frequente na gravidez e está associada ao aparecimento de anemia macrocítica.

Destá forma, a concomitância de um fator que predispõe à anemia macrocítica (deficiência de folatos) e um fator que predispõe à anemia microcítica (deficiência de ferro) resultaria em anemia normocítica.

A suplementação de ferro vem sendo regularmente oferecida às gestantes pela política da Assistência à Saúde da Mulher, conforme protocolo assistencial de pré-natal da SMSA/PBH¹². No entanto, com base somente nos dados atuais não é possível inferir se esta política está revertendo em benefícios reais, pois não há registro de avaliações anteriores para efeito comparativo. Os dados atuais, certamente serão úteis para iniciar uma profícua trajetória histórica que poderá servir de parâmetro para avaliação de programas já implementados na área. Além do mais, o estudo comparativo dos dados obtidos em diferentes momentos, poderá orientar a necessidade de implementação de condutas específicas.

No entanto, apesar da política de suplementação de ferro, 25,8% dos casos de anemia nas gestantes em todas as faixas etárias foram do tipo microcítica/hipocrômica, cuja etiologia poderia ser explicada não apenas pela deficiência de ferro como também por outros fatores, tais como doenças infecciosas diversas, perdas por hemorragias ou redução da absorção de ferro ou mesmo doenças genéticas como as talassemias.

Após a análise dos dados obtidos, torna-se pertinente considerar a necessidade de reforçar programas educacionais enfatizando os riscos e problemas que podem ocorrer durante a gravidez, principalmente na adolescência, já que a gestação nessa faixa etária é mais susceptível à incidência de anemia.

A necessidade de avaliação e ou correlação com outros exames pode ser de grande utilidade para estabelecer com fidedignidade a causa da anemia na gravidez e, conseqüentemente, a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas cabíveis.

Finalmente, a maior vulnerabilidade de jovens adolescentes grávidas à anemia reflete a necessidade de maior assistência e orientação adequada por equipe multiprofissional, principalmente nos Distritos Sanitários atendidos pelos laboratórios distritais LE/NE e N/VN.

CONCLUSÃO

Apesar do esforço desenvolvido pela SMSA/PBH ainda ocorrem casos de anemia em 8,29% das mulheres grávidas atendidas nesta instituição, refletindo a necessidade da continuidade e fortalecimento das ações profiláticas em prol da saúde da mulher.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores Luiz Fernando Azeredo, Celeste Rodrigues e Sônia Gesteira pela valiosa contribuição, sem a qual não seria possível a realização desse estudo.

REFERÊNCIAS

1. BRESANI, Cristiane Campello; SOUZA, Ariani Impieri de; BATISTA FILHO, Malaquias; FIGUEIROA, José Natal - Anemia e ferropenia em gestantes: dissenso de resultados de um estudo transversal. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, 7 (Supl. 1): nov: S15-S22, 2007.
2. CARVALHO, Maria das Graças; SILVA, Maria Belkys Sarmento. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Belo Horizonte: 1988. 139p.
3. FUJIMORI, Elizabeth; LAURENTI, Daniela; NÚÑEZ DE CASSANA, Luz Marina; OLIVEIRA Ida Maria Vianna de; SZARFARC, Sophia Cornbluth - Anemia e Deficiência de Ferro em Gestantes Adolescentes. Rev. Nutr.; Campinas; set./dez.; 13(3): 177-184, 2000.
4. LEAVELL, Byrd Stuart; THORUP JUNIOR, Oscar Andreas. Hematologia clini-

ca. Rio de Janeiro: Interamericana, 1979. 496p.

5. NASCIMENTO, Maria Lourdes Pires - A Hemodiluição da Gestação e os Indicadores para Anemias após Automação Hematológica. *NewsLab*. 71. ed, 136-160, 2005.

6. PIZARRO, Clarissa Flüeler; DAVIDSSON, Lena - Anemia during pregnancy: influence of mild/moderate/severe anemia on pregnancy outcome. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment.*; 25:153-180, jun. 2003.

7. SANTOS, Leonor Maria Pacheco; PEREIRA, Michelle Zanon. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad. Saúde Pública*, 23(1):17-24, jan. 2007.

8. SANTOS, Pedro Nascimento - Prevalência de anemia nas gestantes atendidas em Unidades de Saúde da Família em Feira de Santana, Bahia, entre outubro de 2005 e março de 2006. 2006. 158p. Departamento de Saúde; Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva - Universidade Estadual de Feira De Santana. Feira de Santana - Bahia.

9. TELES, Rosiane Alves de Sousa; VERAS, Danyelle Craveiro de Aquino; SOARES, Maria de Fátima Veloso; AUGUSTO, Ana Paula Andrade; ALENCAR JR, Carlos Augusto. Anemia Aplástica e Gravidez: Relato de Caso. *RBGO*. 24 (4): 343-346, 2002.

10. ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004; 1081p.

11. <http://www.who.int/topics/anaemia/en/>; acesso em dezembro de 2008.

12. http://www.pbh.gov.br/smsa/biblioteca/atmulher/prot_pre_natal_pro_pre_nata.qxd.pdf; acesso em agosto de 2010.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profª. Maria das Graças Carvalho
Rua Stª. Rita Durão, 44/602
CEP. 30140-110 - Belo Horizonte - MG



Há 42 anos, a SBAC se dedica
ao que existe de mais importante
para o seu laboratório...

VOCÊ!

Associe-se à SBAC

www.sbac.org.br

SBAC

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

42 anos com você!

Biossegurança em laboratório clínico. Uma avaliação do conhecimento dos profissionais a respeito das normas de precauções universais

Bio-safeties in clinical laboratory: evaluation of professional's knowleg about universal caution rules

Márcia Andréa Marques, Marco Antonio Costa, Monica Tereza Suldotski, Gislaine Franco de Moura Costa

RESUMO - O risco de acidentes é inerente ao ser humano em qualquer atividade, incluindo a profissionais expostos diariamente à rotina laboratorial. Assim, cuidados devem ser tomados para preveni-los, garantindo a execução apropriada das tarefas. O termo biossegurança é definido como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, tendo por finalidade a saúde do homem e animais, preservação do meio ambiente e qualidade dos resultados. O objetivo deste estudo foi avaliar o conhecimento e o uso das medidas de biossegurança dos funcionários de um laboratório de análises clínicas de um hospital escola da região oeste do Paraná. Para tanto, questionário específico foi aplicado aos funcionários abordando conhecimentos sobre biossegurança e ocorrência de acidentes biológicos. A maioria (81%) afirmou conhecer as medidas de biossegurança; entretanto, estas não são utilizadas de maneira efetiva, tornando-os susceptíveis a acidentes. Faz-se necessária a utilização de estratégias como treinamentos e criação de serviços especializados para a modificação desta realidade.

PALAVRAS-CHAVE - Biossegurança, Risco ocupacional, Prevenção, Acidente Biológico.

SUMMARY - The risk of accidents is inherent to every human being in any activity; including professionals exposed to a daily laboratorial routine. So, attention must be taken to avoid them to guarantee the proper execution of tasks. Bio-safeties is defined as a conjunction of actions devoted to prevention, minimization or risk elimination inherent to activities of research, production, teaching, technological development and service rendered, having as purpose men and animals health, environment preservation and quality of results. This study aims to evaluate knowledge and the usage of bio-safetiness measures by the employees of a clinical analysis' laboratory of a teaching hospital of the west of Paraná state. A specific questionnaire was applied to those employees, asking about bio-safetiness and the occurrence of biological accidents. The greater number (81%) said know about bio-safeties, even though, these rules have not being used in an effective way, becoming susceptible to accidents. It makes necessary the usage of strategies such as training and establishment of specialized service to modify this reality.

KEYWORDS - Bio-safeties, Occupational risk, Prevention, Biological accident.

INTRODUÇÃO

O risco de acidentes é inerente ao ser humano em qualquer atividade, incluindo os profissionais expostos diariamente à rotina laboratorial. Assim, cuidados devem ser tomados para preveni-los e evitá-los, garantindo, desta forma, a execução apropriada das tarefas a serem realizadas¹³.

O termo biossegurança possui uma ampla dimensão sendo definida como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisas, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, tendo por finalidade a saúde do homem e dos animais, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados, sendo que a mesma só pode ser implementada e efetivada com a colaboração e empenho de todos, incluindo-se funcionários em vários níveis de atividades e direção, assegurando condições adequadas em todos os procedimentos rotineiros, sistemas de garantia e qualidade na segurança do trabalho^{5, 8, 13}.

No Brasil a história da Biossegurança é nova e caminha a passos lentos. A primeira legislação classificada como Biossegurança data de 1988, é a Resolução nº 1 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) de 13 de junho de 1988, publicada no Diário Oficial da União (DOU) de 14/06/1988, que visa normatizar as pesquisas em saúde. Apesar de sua importância e pioneirismo, apresentou algumas falhas

como ser muito abrangente e extensa, mas a principal foi a falta de divulgação para as áreas que fariam uso da mesma. Depois desta, outras leis foram normatizadas, mas somente com a lei 11.105, da Presidência da República, de 24 de março de 2005, a biossegurança efetivamente surgiu com a força necessária. A partir dessa, lei criou-se a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio - com o objetivo de propor e estabelecer toda a política Nacional de Biossegurança, publicando Normas e Instruções Normativas que devem ser cumpridas em todos os níveis^{3, 18}. A legislação supra citada classifica o laboratório clínico como uma área restrita, com exceção das salas de coleta de material, recepção e áreas administrativas, que são abertas ao público em geral. Ao interior do laboratório só é permitido o acesso de pessoal autorizado, evitando, desta forma, que pessoas não envolvidas com a rotina laboratorial corram risco de acidentes^{3, 16, 18}.

De acordo com o publicado por HIRATA & MANCINI, (2002)¹², quando se trabalha de maneira planejada e organizada, a exposição a agentes considerados de risco à saúde é minimizado e, sem dúvida evita acidentes, pois, em ambiente laboratoriais, podem ser encontrados diversos tipos de riscos, classificados, de acordo com a gravidade, em desprezíveis, marginais, críticos ou catastróficos. Ao analisar-se o ambiente laboratorial, constata-se que, apesar dos esforços em investimento para o aprimoramento de profissionais e dos processos tecnológicos, além da

Recebido em 15/04/2009

Aprovado em 04/08/2010

Curso de Farmácia - Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - Campus de Cascavel - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)
gismc@yahoo.com.br

renovação em equipamentos, pouco tem sido feito para prevenir o surgimento de lesões e enfermidades ocupacionais e de impactos ambientais, também causadores de doenças ou outros danos^{2, 11}.

Dentre os riscos presentes no laboratório clínico, nota-se, principalmente, atitudes inconsequentes como preparação e manuseio de soluções tóxicas e materiais biológicos sem utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados, bem como condições ambientais de insegurança, aspectos ergonômicos em desacordo com as normas de biossegurança, equipamentos defeituosos ou mal calibrados em utilização, com conseqüentes riscos a trabalhadores; salas com móveis, equipamentos e acessórios inadequados, muitas vezes improvisados, localizados de maneira incorreta, prejudicando a segurança do trabalhador e diminuindo o seu rendimento e sua satisfação para realização de tarefas¹¹. Segundo LEWIS *et al.*, (2006)¹⁴, a segurança de trabalho é essencial em todas as situações e locais do laboratório, sendo que cada laboratório deve designar um responsável pela segurança, com conhecimento e nível hierárquico que lhe permitam implementar a política de segurança, a qual deve estar documentada em manual, de fácil acesso e entendimento, em todas as seções do laboratório, e que nenhum funcionário deve ser autorizado a manusear material potencialmente perigoso antes de receber um treinamento completo de acordo com os requisitos de segurança. Diante do exposto, este estudo tem por objetivo o levantamento de dados sobre conhecimento e aplicação das normas de biossegurança pelos profissionais do serviço de diagnóstico laboratorial, de um hospital escola da região oeste do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

A realização do estudo envolveu a aplicação de questionários e treinamento sobre biossegurança a profissionais do serviço de diagnóstico laboratorial, de um hospital escola da região oeste do Paraná.

Foram desenvolvidos dois questionários fechados, de auto-preenchimento, com questões relativas ao conhecimento e aplicação das normas de biossegurança. O primeiro foi aplicado antes do treinamento e o segundo após o mesmo. O preenchimento foi voluntário e o questionário era anônimo e não vinculado.

Um total de 16 funcionários do laboratório de análises clínicas do hospital escola preencheram os formulários.

Esta pesquisa obteve aprovação do comitê de ética para a sua realização e todos participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados foram avaliados pelo programa de análise estatística Epi-Info 6.02.

RESULTADOS

Após análise dos resultados, os mesmos mostraram que a maioria dos funcionários tem conhecimento do significado do termo biossegurança (13 - 81%), sendo que apenas 3 (19%) desconheciam o termo.

Quando avaliou-se o conhecimento sobre biossegurança em relação ao nível de escolaridade, observou-se que os 10 funcionários com maior grau de instrução (62,5%), superior incompleto e acima, têm conhecimento pleno do significado do termo "Biossegurança", bem como 3 (18,75%) dos que possuem ensino médio completo. Entre aqueles que desconhecem o termo, 2 (12,5%) possuem o ensino fundamental completo e um possui o ensino médio completo (6,25%). Estes dados estão demonstrados na Fig 1.

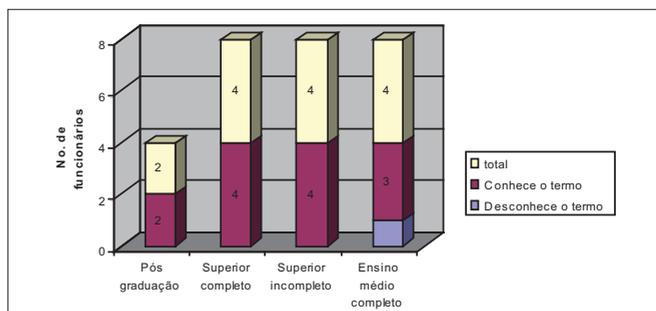


Fig 1. Avaliação do conhecimento sobre o significado do termo "Biossegurança" em comparação com o grau de instrução

Em relação ao grau de conhecimento sobre o assunto biossegurança, 7 (43,75%) afirmaram saber muito sobre o assunto, outros 7 (43,75%) afirmaram saber pouco e 2 (12,5%) afirmaram saber quase nada sobre o assunto, nenhum afirmou desconhecer totalmente o assunto (Fig. 2).

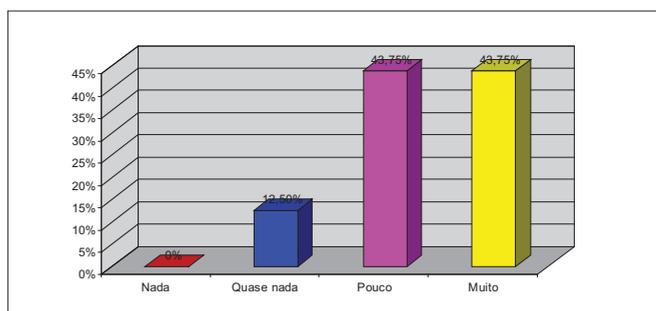


Figura 2 - Grau de conhecimento sobre o tema biossegurança

Ao todo, 15 (93,25%) profissionais relataram fazer uso das medidas universais de biossegurança. Quando questionados sobre medidas específicas, 13 (81,25%) relataram fazer uso de jaleco; 15 (93,75%) uso de luvas; 11 (68,75%) uso de máscaras, 8 (50%) uso de óculos de proteção e apenas 1 (6,25%) relatou o uso de touca (Fig. 3). Levando-se em consideração as variáveis anteriores, tem-se que 15 (93,75%) da população analisada faz uso de pelo menos uma das medidas de biossegurança.

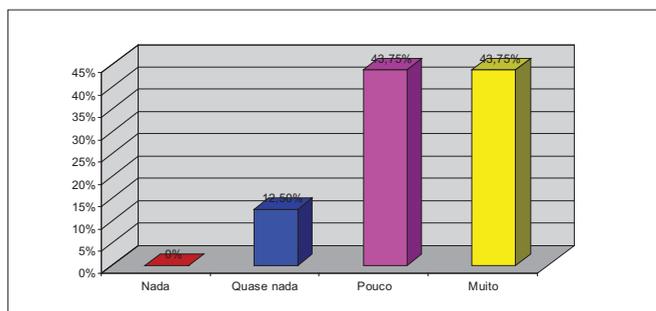


Figura 3 - Utilização de EPIs por parte dos entrevistados

De todos os entrevistados, 13 (81,3%) gostariam de receber mais informações sobre o tema e 3 (18,7%) não sentem necessidade de receber mais informações sobre o assunto. Quanto ao fato de já terem recebido algum tipo de treinamento e/ou orientação sobre o assunto, 12 (75%) afirmaram positivamente e 4 (25%) responderam de forma negativa. Quando analisou-se a ocorrência de acidentes biológicos segundo o tempo de serviço, observou-se os seguintes resultados: entre aqueles que trabalham de 1 a 5 anos 1 (50%) já sofreu acidente biológico, acima de 10 anos, 3

(75%) dos entrevistados já sofreram acidentes biológicos e entre 5 a 10 anos de serviço nenhum funcionário sofreu acidente (Fig. 4).

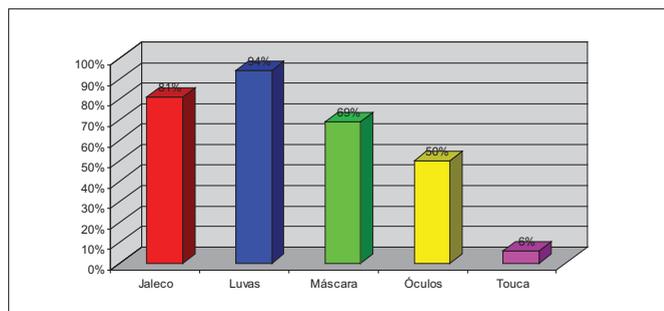


Figura 4. Relação entre ocorrência de acidente biológico e o tempo de serviço.

Analisando-se a função específica de cada funcionário e se este já sofreu acidente biológico, tem-se que: dos 4 indivíduos que já sofreram acidente (25%), 3 (75%) trabalham na coleta de material biológico (auxiliares de enfermagem) e 1 (25%) é farmacêutico, o restante dos funcionários não relata ocorrência de acidentes.

Após a realização do treinamento, quando questionados se haveria necessidade de mudança de comportamento em relação às normas de segurança, dentre os que já haviam sofrido acidente biológico, 2 (12,5%) responderam que acham necessário uma mudança de atitude, 1 (6,25%) acha que não é necessário a mudança e 1 (6,25%) não respondeu; o restante que não foi vítima de acidente respondeu da seguinte forma: 5 (31,25%) acham que não é necessária nenhuma mudança de comportamento, 4 (25%) acham necessária uma mudança de atitude e 3 (18,75%) não responderam (Fig. 5).

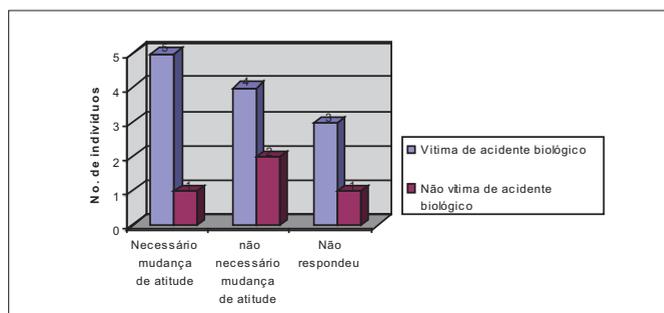


Figura 5 – Relação de acidente biológico com necessidade de mudança de atitude em relação as normas de biossegurança.

Perguntados se colocarão em prática as informações adquiridas no treinamento, 10 (62,5%) afirmaram que irão utilizar as informações rotineiramente e 6 (37,5%) não responderam a questão.

A respeito da mudança de atitude após sofrer acidente biológico, 12 (75%) relataram nunca haver sofrido acidente, 2 (12,5%) relataram ter aumentado os cuidados com a segurança, 1 (6,75%) aumentou os cuidados temporariamente e depois voltou a descuidar-se e 1 (6,75%) não respondeu a questão (Fig. 6).

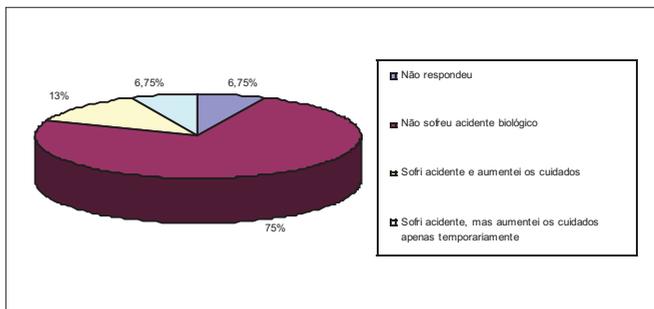


Figura 6 - Aumento das medidas de biossegurança após acidente biológico

DISCUSSÃO

A rotina em um laboratório de análises clínicas é intensa e muitas vezes estressante. Assim, os profissionais, por descuido, esquecimento ou mesmo por negligência, menosprezam as ações de segurança no laboratório clínico. Neste estudo confirmou-se esta realidade, demonstrando que, apesar do conhecimento dos funcionários sobre normas de biossegurança, o conhecimento do significado do termo e o grau de escolaridade não diminuem o risco de acidente biológico. Estes resultados estão de acordo com CAIXETA & BARBOSA, (2005)⁵, em estudo realizado em um estabelecimento de saúde, onde foi constatado que, apesar do fato dos profissionais afirmarem saber o significado do conceito de biossegurança, não houve influência no coeficiente de acidentabilidade e dados obtidos neste estudo comprovam que, mesmo dentre aqueles que afirmaram saber muito sobre o termo ou ainda que possuíam um elevado grau de instrução, ocorrem acidentes biológicos.

Esta pesquisa comprova que, apesar de terem conhecimento sobre as normas de segurança no trabalho e também sobre o alto risco de contaminação, nem sempre a possibilidade de contaminação é levada em consideração e, ainda, existem profissionais que não utilizam todos os EPIs necessários a sua proteção. Isso se justifica quando toma-se como exemplo a utilização de óculos de proteção; apenas uma parcela (50%) dos entrevistados declarou que faz uso deste aparato. Estes resultados corroboram os estudos realizados por FAYEL *et al*, (1991)¹⁰ e CIORLIA & ZANETTA, (2007)⁹ que observaram que além do conhecimento, também é necessário que se apliquem corretamente as medidas de precaução universal pois, como o contato com materiais infectantes faz parte da rotina diária do profissional de saúde, nem sempre esse material é manipulado de forma correta ou ainda não é levado em conta o cuidado com o uso de medidas de universais de biossegurança.

Segundo vários autores, o número de acidentes envolvendo material biológico pode ser reduzido se forem realizados serviços de orientação e implementação das normas de biossegurança no ambiente de trabalho^{6, 17, 19}. Estes dados confirmam a necessidade de implantação de um serviço de biossegurança, para realização de treinamentos e supervisão em serviço. Grande parte dos entrevistados, (81,3%), declarou que gostariam de obter mais informações sobre o assunto. Dados coletados após realização do treinamento, constatam que a maioria (62,5%) irá implantar as informações na sua rotina de trabalho.

Neste trabalho constatou-se que a maioria dos profissionais que se acidentaram eram funcionários que trabalhavam há mais de 10 anos no hospital. De acordo com MACHADO *et al*, (1992)¹⁵; BREVIDELLI & CIANCARUL-

LO, (2001)⁴, o tempo de experiência profissional também demonstrou influenciar sobremaneira a ocorrência de acidentes biológicos e a aplicação das medidas preventivas. Entre os trabalhadores do laboratório, o auxiliar de enfermagem, que trabalha na coleta, é o mais exposto aos acidentes, devido sua atividade consistir basicamente na manipulação de materiais pérfuro-cortantes utilizados durante a coleta de materiais para a realização de exames, ficando o analista clínico em segundo lugar. Estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura, pois diversos pesquisadores relatam resultados similares em seus trabalhos^{1, 4, 5, 7, 15}.

CONCLUSÕES

A constante exposição a procedimentos e a materiais biológicos, potencialmente infectantes, o grau de conhecimento e a prática de medidas de biossegurança não altera a rotina de execução das tarefas diárias. Ao contrário, alguns profissionais negligenciam as leis de biossegurança e só voltam a utilizar as medidas universais de biossegurança, de maneira mais rigorosa, quando um acidente biológico ocorre, e por pouco tempo.

Apesar de afirmarem ter conhecimento sobre biossegurança, nem todos os funcionários seguem as normas de maneira efetiva, o que os torna mais susceptíveis a acidentes biológicos, pois a exposição a procedimentos e materiais potencialmente infectantes é elevada.

Os profissionais que sofreram acidentes não buscaram conhecimento, ou não tiveram acesso a eles, o que realça a atitude negligente por parte desses profissionais, bem como de seus superiores imediatos, ou a existência de uma falsa sensação de segurança.

A aplicação das precauções universais requer, além de novas instruções, mudança de conceitos e hábitos antigos, o que pode gerar um certo conflito entre os profissionais mais antigos.

Como são poucos os dados constantes na literatura sobre o assunto aqui abordado, espera-se contribuir para a disseminação do conhecimento sobre este tema, bem como incentivar a formação de uma consciência em biossegurança, para que a utilização das normas universais se torne um hábito na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

1. BALSAMO, A.C.; FELLI, V. E. A.. Study of work accidents related to human body fluids exposure among health workers at a university hospital. Rev. Latino-Am. Enfermagem, Ribeirão Preto, vol. 14, n. 3, 2006.
2. BRASIL. FS. Gerência de riscos / APR – análise preliminar de riscos. Rio de Janeiro: Ed. Funcefet, 2002.
3. BRASIL. Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº1 de 13 de junho de 1988.

4. BREVIDELLI, M. M.; CIANCIARULLO, T. I.. Aplicação do modelo de crenças em saúde na prevenção dos acidentes com agulha. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 35, n. 2, 2001.
5. CAIXETA, R. B.; BARBOSA-BRANCO, A.. Acidente de trabalho, com material biológico, em profissionais de saúde de hospitais públicos do Distrito Federal, Brasil, 2002/2003. Cadernos de Saúde Pública, vol.21, n. 3, 2005.
6. CANINI, S. R. M. S.; GIR, E.; HAYASHIDA, M.; MACHADO, A. A.. Needlestick injuries among nursing staff members at a university hospital in the interior of São Paulo State. Revista Latino-Americana de Enfermagem, vol.10, n. 2, 2002.
7. CANINI, S. R. M. S.; GIR, E.; MACHADO, A. A.. Accidents with potentially hazardous biological material among workers in hospital supporting services. Revista Latino-Americana de Enfermagem, vol.13, n. 4, 2005.
8. CARVALHO, A. B. M.. Integração de sistemas – foco na qualidade, meio ambiente, saúde e segurança. Banas Ambiental 2000.
9. CIORLIA, L. A. S.; ZANETTA, D. M. T.. Hepatite C em profissionais da saúde: prevalência e associação com fatores de risco. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 41, n. 2, 2007.
10. FAYEL, B. J.; KOZIOL, D. E.; BANKS, S. M.; HENDERSON, D. K.. Frequency of nonparenteral occupational exposures to blood and body fluids before and after universal precautions training. Am. J. Med., v 90, n 2: 145-53, 1991.
11. FERNANDES, G. S.; CARVALHO, A. C. P.; AZEVEDO, A. C. P.. Avaliação dos riscos ocupacionais de trabalhadores de serviços de radiologia. Radiol Bras, São Paulo, v. 38, n. 4, 2005.
12. HIRATA, M. H.; MANCINI, J.. Manual de biossegurança. Barueri, SP: Ed Manole, 2002.
13. LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná. Manual de Biossegurança e Segurança Química em 6. Laboratório de Saúde Pública. Curitiba, PR: 2000.
14. LEWIS, S. M.; BAIN, B.; BATES, I.. Hematologia prática. 9 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006.
15. MACHADO, A. A.; COSTA J. C.; GIR, E.; MORIYA T. M.; FIGUEIREDO, J. F. C. Risk of infection by the human immune deficiency virus (HIV) among health professionals. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 26, n. 1, 1992.
16. MENDONÇA, C. R. L.. Boas Práticas Laboratoriais. Teresópolis, RJ: Live Ed. Eventos de Teresópolis, 1998.
17. SIMÕES, M.; LEMES-MARQUES, E. G.; CHIARINI, P. F. T.; PIRES, M. F. C.. O uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs) nos acidentes ocorridos em um laboratório de Saúde Pública no período de maio de 1998 a maio de 2002. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 62, n. 2, 2003.
18. SOUZA, M. M.. Biossegurança no Laboratório Clínico. Teresópolis, RJ: Ed Eventos, 1998.
19. TOLEDO-JUNIOR, A. C. C.; RIBEIRO F. A.; FERREIRA, F. G. F.; FERRAZ, R. M.; GRECO, D. B. Conhecimento, atitudes e comportamentos frente ao risco ocupacional de exposição ao HIV entre estudantes de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 32, n. 5, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Gislaine Franco de Moura-Costa
Universidade do Oeste do Paraná
E-mail: gisfmc@yahoo.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

Soroprevalência de Toxoplasmose em pacientes de Hemodiálise atendidos em Erechim/RS*

Seroprevalence of toxoplasmosis in patients of hemodialysis taken care in Erechim/RS

Aline Gilioli¹; Sandra Manoela Dias Macedo²; Márcia Maria Falkoski Vieira³; Jean Carlos Zanardo⁴ & Marisa Lúcia Romani Paraboni⁵

RESUMO - A Toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, sua alta prevalência relaciona-se a fatores sócio-econômicos, idade e, também, referente à área geográfica. Clinicamente, apresenta importância quanto ao risco que representa às pessoas imunocomprometidas, às gestantes e ao feto. Foi realizado um estudo de caso-controle com o objetivo de avaliar a prevalência de toxoplasmose de 46 pacientes do grupo caso com insuficiência renal crônica e de 25 pacientes do grupo controle. Para o grupo caso foram avaliados fatores como tempo de hemodiálise, número de sessões por semana, tempo de sessão e outras doenças associadas. Para os dois grupos foi avaliado o contato com animais domésticos e hábitos alimentares. Foram dosados anticorpos anti-Toxoplasmose IgG e IgM, diagnosticado anti-Toxoplasmose IgG Reagente em 31 (68%) dos pacientes em hemodiálise, 19 (76%) de pacientes do grupo controle. A presença de anticorpos anti-Toxoplasmose IgM foi encontrada em 2 (4,3%) dos pacientes em hemodiálise e nenhum paciente do grupo controle. Os resultados mostram que a prevalência de toxoplasmose em fase aguda, nos pacientes em hemodiálise, indica o uso do teste na rotina, como medida de tratamento aos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE - Toxoplasmose; *Toxoplasma gondii*; Insuficiência Renal Crônica

SUMMARY - *Toxoplasmosis is a zoonosis of world-wide distribution; its high prevalence becomes related to socio-economic factors, age and also referring to the geographic area. Clinically, it presents importance to the risk which represents the immunocompromised people, to the pregnant and the embryo. It was carried through a case-control study with the objective to evaluate the toxoplasmosis prevalence of 46 patients from the case group with chronic renal insufficiency and of 25 patients from control group. For the case group had been evaluated factors as hemodialysis time, number of sessions per week, session time and other associate illnesses. For the two groups had been evaluated contact with domestic animals and alimentary habits. It had been dosed Toxoplasmosis IgG and Toxoplasmosis IgM antibodies, diagnosed Toxoplasmosis IgG reacting in 31 (68%) from the hemodialysis patients, 19 (76%) from control group patients. The Toxoplasmosis IgM antibodies presence was found in 2 (4.3%) in hemodialysis patients and no patient from control group. The results show that the toxoplasmosis prevalence in acute phase, in hemodialysis patients, indicates the use of the routine test, as treatment measured to the patients.*

KEYWORDS - *Toxoplasmosis, Toxoplasma gondii. Chronic renal deficiency.*

INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma doença de grande distribuição mundial e que se apresenta na população humana com uma alta prevalência, principalmente no que se refere a fatores sócio-econômicos, idade e também referentes à área geográfica. Em regiões tropicais, sua taxa de prevalência é superior em comparação às áreas áridas, em regiões frias e quentes, onde se denota sua baixa prevalência^{12, 18}.

A transmissão do *Toxoplasma gondii* ocorre através da ingestão de carne inadequadamente cozida, de solos contaminados e o contato direto com gatos também é uma forma expressiva da contaminação. Pode ocorrer contaminação através da má lavagem de frutas e verduras e ainda quando instrumentos e superfícies utilizadas no preparo dos mesmos não estiverem limpos^{13, 14}.

O *Toxoplasma gondii* apresenta-se sob três estágios de desenvolvimento: a forma de oocisto, que são as formas resultantes do ciclo sexuado do parasita, ocorrendo no trato gastrointestinal dos felídeos, são considerados a forma de resistência, tanto em relação às condições do meio ambiente quanto por possuir uma parede muito resistente, o que permite permanecerem infectantes no solo úmido e sombreado por mais de um ano. São eliminados nas fezes ainda não esporulados, tornando-se infectantes após a esporulação no meio ambiente. Na forma de taquizoíto ou trofozoíto, aparecem na fase aguda da infecção e possuem

multiplicação rápida, são móveis e encontram-se sob a forma livre ou proliferativa. Possui pouca resistência a ação do suco gástrico os quais são destruídos em um curto intervalo de tempo e estão presentes na fase aguda da doença. Os bradizoítos, que estão presentes em diversos tecidos (músculos e sistema nervoso) e, em geral, presentes na fase crônica e congênita da infecção, possuem multiplicação lenta, apresentam mais resistência em relação ao conteúdo do suco gástrico e possuem a característica de permanecerem nos tecidos por muitos anos¹¹.

Os principais sintomas da infecção pelo *Toxoplasma gondii* são dores musculares, astenia, lesões cutâneas, amigdalite, febre, secreção ocular bilateral muco purulenta e anorexia¹⁸. Na grande maioria das vezes, o contágio se dá pela ingestão de oocistos que foram eliminados pelas excretas de felídeos, que são resistentes às variações de temperatura e de umidade e que podem permanecer por um longo período de tempo no solo. Outra forma de transmissão é pelo consumo de carnes que contenham os bradizoítos, principalmente se foram consumidas cruas ou pouco cozidas⁴.

A toxoplasmose do tipo adquirida não necessita de tratamento medicamentoso, pois o próprio sistema imunológico tende a eliminar o parasita do organismo. Para a fase crônica da infecção, ainda não existe um medicamento que seja eficaz contra a toxoplasmose, o qual atua contra os taquizoítos, mas não contra os cistos. Já em casos onde a toxoplasmose assume papel grave, como nos pacientes imunocomprometidos e em gestantes, justifica-se o tratamento medi-

Recebido em 13/02/2009

Aprovado em 11/08/2010

*Curso de Farmácia, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI - Campus de Erechim.

¹Graduanda do curso de farmácia habilitação Bioquímica Clínica URI - campus Erechim

²Farmacêutico Bioquímico, Professora do Departamento de Ciências da Saúde, URI - campus Erechim

³Enfermeira Nefrologista, serviço de Hemodiálise FHSTE- Erechim/RS

⁴Médico Nefrologista, Serviço de Hemodiálise FHSTE, Erechim/RS

⁵Professora de Imunologia, Departamento de Ciências da Saúde, URI - campus Erechim

camentoso utilizando-se sulfatiazina, pirimetamina e espi-ramicina, a fim de eliminar de forma rápida e impedir a multiplicação do parasita evitando assim o aparecimento de seqüelas em fetos de mães infectadas, bem como recidivas em pacientes com imunidade comprometida^{11,12}.

Estima-se que 40% da população mundial adulta está infectada pelo *Toxoplasma gondii*¹⁶. Em cidades como no Recife, essa taxa tem uma variação de 64% a 79%⁷. Em um estudo realizado em Porto Alegre, no ano de 2003, para um grupo de gestantes foram registradas prevalências de 60% chegando até 74,5% de positividade. Em outro estudo realizado em 1999, de pacientes com problemas oculares, na zona rural do Paraná, houve positividade de aproximadamente 83% em relação ao inquérito realizado¹². No Brasil, tem sido determinada uma soroprevalência que varia entre 50% até 80%³. Em adultos, essa taxa de prevalência, que chega até 80%, tende a crescer conforme o aumento da faixa etária⁴. Estudos demonstram a prevalência de retinocoroidite toxoplásmica em aproximadamente 17,7% da população da cidade de Erechim-RS, pertencentes a uma região rural. Essa prevalência foi ainda maior, de 21,3%, se for considerado apenas indivíduos maiores de 13 anos¹⁸.

Clinicamente, a toxoplasmose apresenta importância quanto ao risco que representa às pessoas imunocomprometidas, às gestantes e ao feto, no potencial de causar lesões oculares tardias, como a retinocoroidite, levando a cegueira, e problemas neurológicos, como algumas deformidades congênitas e a presença do retardamento mental¹⁸.

Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose muito raramente apresenta importância clínica¹⁰. Em pacientes com ação imunológica deficiente (imunocomprometidos), o parasita invade os tecidos e atinge os órgãos, dando origem aos taquizoítos, onde causa as formas mais graves da toxoplasmose⁴. No grupo de risco, onde se inclui pacientes receptores de órgãos, imunocomprometidos, em tratamento quimioterápico e aqueles infectados pelo HIV, a toxoplasmose causa retinite, encefalite ou doença disseminativa¹².

Em pacientes candidatos a receber algum tipo de órgão sólido, como, por exemplo, rins, a toxoplasmose pode se apresentar sob a forma disseminada e do tipo aguda, no que se refere àquele paciente até então soro-negativo para Toxoplasmose e recebe este órgão de algum doador infectado cronicamente ou até pela reagudização da infecção progressa, tornando este receptor um forte candidato a desenvolver a parasitose^{6,17}. Existem na literatura, cerca de 30 casos relatados de infecções sistêmicas causadas pelo *Toxoplasma gondii* em receptores de transplante renal, sendo considerada rara neste procedimento⁶.

Para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem sido feita a pesquisa de anticorpos contra o parasita, do tipo IgM, presente apenas na fase aguda da doença, diferenciando da infecção latente que é muito comum na maioria da população. Essa sorologia para toxoplasmose possui importância relevante para gestantes e pacientes imunocomprometidos, pois define data de contágio na gestante, ou a reagudização da forma latente da toxoplasmose, nos pacientes com imunidade baixa⁴. Ao contrário da detecção de anticorpos IgM representarem um contágio recente e não especificamente a infecção ativa no organismo, a presença de anticorpos IgG caracteriza um marcador de infecção progressa ou latente, dependente da resposta humoral do indivíduo⁴.

O objetivo deste estudo foi analisar a prevalência de toxoplasmose de pacientes com insuficiência renal crônica, que realizam hemodiálise em um hospital de referência na cidade de Erechim/RS e em pacientes normais da população geral.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foram avaliados 46 pacientes do grupo com insuficiência renal crônica, em hemodiálise, de ambos os sexos, com idade variando de 21 a 75 anos, atendidos no setor de hemodiálise de um Hospital da cidade de Erechim. Foram selecionados como grupo controle 25 voluntários da comunidade, com idade entre 21 e 75 anos, sem insuficiência renal crônica, de ambos os sexos.

Após esclarecimentos sobre os objetivos, procedimentos e benefícios do estudo, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa da URI - Campus de Erechim, que o estudo foi aprovado.

Foram aplicados questionários, adaptados de estudos de caso-controle, pela equipe de pesquisadores, para ambos os grupos. Foram realizadas perguntas referentes a fatores de risco como comer carne e vegetais, de que maneira preparava os alimentos, e a exposição a animais.

Para cada paciente do estudo, foi coletada amostra de 5 ml de sangue para realização dos testes sorológicos e bioquímicos. O método para dosagem de Toxoplasmose foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura para detecção IgM, e ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG, ambos da marca RADIM®. Os testes de uréia e creatinina foram utilizados para avaliar a insuficiência renal, tanto no grupo caso como no grupo controle, dosados por metodologia de química seca, Johnson e Johnson ®. O protocolo de testes e o cálculo dos valores de referência foram desenvolvidos segundo recomendações do fabricante.

Análise Estatística: No estudo, a análise estatística foi desenvolvida através dos Teste t e do teste Chi-Sq (χ^2). Para o teste Chi-Sq(χ^2), um valor de $p < 0,05$ prediz uma associação estatística para a variável estudada. Valores de $p > 0,05$, não existe associação estatística em relação às variáveis em questão.

RESULTADOS

No presente estudo, 31 dos 46 (67,4%) pacientes de hemodiálise e 19 dos 25 (76%) voluntários controle foram positivos para anticorpos IgG (Fig. 1).

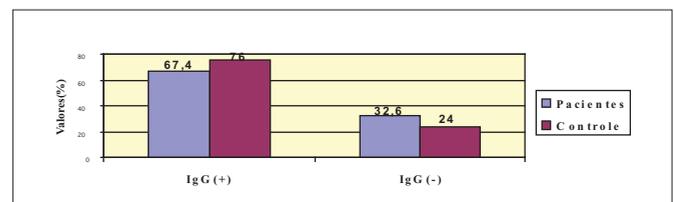


Figura 1: Distribuição de Pacientes, Controles e Soropositividade para Toxoplasmose IgG

A percentagem de positividade de pacientes em hemodiálise, para Anticorpos anti IgG, foi de 67,4%, não havendo significância estatística ($P > 0,05$) em relação ao grupo controle que apresentou positividade de 76%.

Dois pacientes de hemodiálise foram positivos para o Anticorpo IgM (4,34%). No grupo controle não foi encontrado nenhum paciente com IgM reagente.

Neste estudo, foi investigada a relação entre o número de sessões por semana, o tempo de cada sessão e o tempo de tratamento (hemodiálise) com a soropositividade de anticorpo anti IgG. Não houve associação estatística entre estas variáveis em relação ao fato de ser paciente de hemodiálise e apresentar soropositividade para o anticorpo IgG (Tabela 1 e 2).

TABELA I
Distribuição dos pacientes de hemodiálise em relação ao tempo de hemodiálise.

Tempo de Hemodiálise(meses)	IgG Reagente	IgG Não Reagente
4 ¼ 20	9	6
21 ¾ 40	9	5
> 40	13	4
Total	31	15

TABELA II
Distribuição dos pacientes de hemodiálise em relação ao tempo da sessão.

Tempo da sessão	IgG Reagente	IgG Não Reagente
Até 3horas e 15 min	4	3
» 4 horas	27	12
Total	31	15

Em relação ao número de vezes por semana que os pacientes realizam hemodiálise, apenas um paciente realiza duas vezes por semana, os demais, 3 vezes por semana. Neste estudo, tanto os pacientes do grupo caso, como os do grupo controle, foram divididos em faixas etárias. A média de idade dos pacientes hemodialisados foi de 52,73 anos com desvio padrão de 15,25 anos. Em relação à idade dos pacientes em hemodiálise, os resultados de positividade para o anticorpo anti IgG, não teve associação estatística com a faixa etária (Tabela 3).

TABELA III
Distribuição dos pacientes de hemodiálise em relação à faixa etária.

Faixa etária (anos)	IgG Reagente	IgG Não Reagente
21 ¼ 30	2	2
31 ¾ 45	7	4
46 ¾ 61	11	4
> 61	11	5
Total	31	15

O presente estudo também dividiu em faixas etárias os pacientes pertencentes ao grupo controle de acordo com as respectivas faixas etárias conforme a tabela 4.

TABELA IV
Distribuição dos pacientes do grupo controle em relação à faixa etária.

Faixa etária (anos)	IgG Reagente	IgG Não Reagente
21 ¼ 35	2	2
36 ¾ 50	9	3
> 50	8	1
Total	19	6

Em relação ao grupo controle, a média de idade dos pacientes foi de 46, 84 anos com desvio padrão de 12,64 anos. Quanto à faixa etária, houve predominância de 36-50 anos, seguida de pacientes com mais de 50 anos, mas não houve nenhum tipo de associação entre pertencer a estas faixas etárias e ser soropositivo para IgG.

Dos 31 pacientes com anticorpo IgG positivo, 19 (61,3%) eram do sexo masculino e 12 (38,70%) eram do sexo feminino. Dos 15 pacientes com anticorpo IgG não reagente, 7

(46,66%) e 8 (53,33%) eram do sexo feminino, não existindo diferença significativa em relação ao sexo e a relação entre positividade para o anticorpo IgG.

No estudo foram analisadas associações entre doenças associadas e positividade para anticorpos IgG, para os pacientes de hemodiálise (Fig. 2).

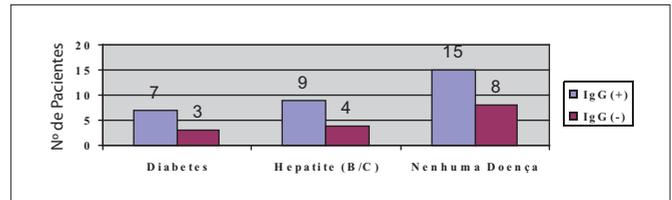


Figura 2: Doenças Associadas e Soropositividade para Toxoplasmose IgG

As doenças associadas foram Diabetes, Hepatite B e C e, também, o fato de não possuir nenhum tipo de doença associada ao processo de hemodiálise. Não houve associação entre estas doenças associadas e sorologia positiva para o anticorpo IgG.

Neste estudo, foram investigadas possíveis associações entre soropositividade de anticorpo IgG com fatores de risco relacionados a hábitos alimentares, contato com animais do grupo caso e grupo controle (Fig. 3).

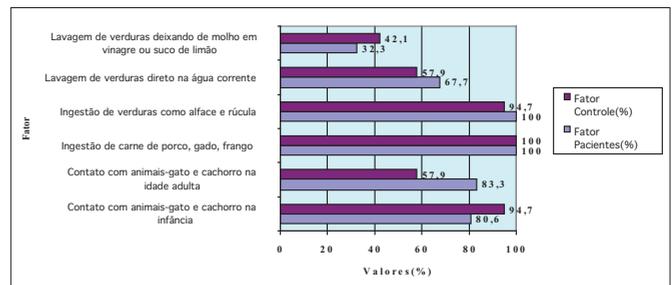


Figura 3: Fatores associados com a contaminação por Toxoplasma gondii IgG (+), de pacientes em hemodiálise e de pacientes do grupo controle

A figura 3 indica presença de fatores de associação, relacionados como hábitos alimentares e modo de preparo dos vegetais. Não foi encontrada associação significativa entre casos e controle com a soropositividade do anticorpo IgG. Para o grupo controle, 7 pacientes tinham histórico familiar com toxoplasmose, a resposta de todos os pacientes para cozimento de carne bem passada, todos os pacientes comem salame, mas eventualmente. Não houve associação estatística entre essas variáveis e ser reagente para IgG. Em relação aos pacientes de hemodiálise, 22 deles tinham histórico familiar de toxoplasmose, dos 46 entrevistados. Todos os pacientes para cozimento de carne bem passada, apenas 1 não comia salame e, dos que comiam, todos eventualmente. Não houve associação estatística entre ser reagente para IgG e as variáveis citadas neste grupo.

A presença ou ausência de insuficiência renal crônica dos dois grupos foi verificada realizando a dosagem de uréia e creatinina, os valores encontrados estão mostrados nas tabelas 5 e 6, usando-se o Teste t, para análise estatística.

TABELA V

Valores de uréia dos pacientes em hemodiálise e do grupo controle

Variáveis	Grupo caso Uréia	Grupo controle Uréia
Média md/dl(±DP)	131,58(33,75)	32,24(6,55)

DP=Desvio Padrão t= 19,4 P<0,001

TABELA VI

Valores de creatinina dos pacientes em hemodiálise e do grupo controle

Variáveis	Grupo caso Creatinina	Grupo controle Creatinina
Média md/dl(±DP)	9,02(2,16)	0,78(0,14)

DP= Desvio Padrão t= 25,7 P<0,001

DISCUSSÃO

Em pacientes imunocompetentes, a toxoplasmose adquirida apresenta menor risco mas, em pacientes candidatos a transplante renal, a toxoplasmose recente (aguda) sintomática, mesmo sendo rara, pode apresentar maior gravidade e uma alta taxa de mortalidade, se não diagnosticada e tratada precocemente⁹.

O estudo em questão procurou demonstrar o índice de positividade de anticorpos anti-*T. gondii* em um grupo de 46 pacientes com insuficiência renal crônica, submetidos a procedimentos de hemodiálise e também de 25 pacientes do grupo controle da população. Verificou-se que este índice alcançou a taxa de 67,4% em relação aos pacientes do grupo de que realizam hemodiálise e uma taxa de 76% de positividade em pacientes do grupo controle. Este índice de soropositividade de toxoplasmose em pacientes de hemodiálise foi superior a estudos realizados por Yazar *et al.*, (2003), que descreve o percentual de positividade de anticorpos anti-*T. gondii* dos 173 pacientes em hemodiálise como sendo de 56,06% e inferior ao estudo desenvolvido por Carmo *et al.*, (2004), onde a porcentagem encontrada foi de 82,93% para 68 pacientes estudados. Aproximou de outro estudo realizado por Ocak *et al.*, (2005) que descreve a soropositividade de 76,5% em um grupo maior, com 255 pacientes em hemodiálise.

Em relação ao grupo controle com 25 pacientes, foi verificada a positividade de 76%, superior a porcentagem encontrada nos estudos realizado por Yazar *et al.*, 2003, onde 20% (8) dos 40 pacientes do grupo controle apresentaram positividade de anticorpos anti-*T. gondii* e também pelo estudo descrito por Ocak *et al.*, (2005) onde a porcentagem de soropositividade no grupo controle de 50 pacientes foi de 42% (21).

A positividade de anticorpos anti-*T. gondii* no grupo de 46 pacientes de hemodiálise foi de 2 (4,34%) para IgM. Este índice de positividade pode ser considerado elevado, pois estudos realizados por Ocak *et al.*, (2005) demonstram a positividade de 2 (0,8%) de 255 pacientes de hemodiálise. Outro estudo desenvolvido por Carmo *et al.*, (2004) de 82 pacientes com insuficiência renal crônica, nenhum deles apresentou soropositividade para IgM. Em comparação ao estudo de Yazar *et al.*, (2003) a soropositividade para o grupo de pacientes em hemodiálise foi de 1,73%, inferior ao encontrado neste estudo.

A partir deste dado de soropositividade para IgM, 2 (4,34%) dos pacientes de hemodiálise no estudo, verificase a presença de toxoplasmose aguda.

No presente estudo, nenhum paciente do grupo controle apresentou IgM reagente, dos 25 pacientes investigados, caracterizando assim a ausência da infecção aguda. Este dado condiz com o estudo realizado por Yazar *et al.*, (2003) onde verificou que dos 40 pacientes do grupo controle, nenhum apresentou soropositividade para o anticorpo

IgM, caracterizando, assim, a ausência de toxoplasmose aguda no grupo estudado. E no estudo desenvolvido por Ocak *et al.*, (2005) também nenhum paciente do grupo controle apresentou soropositividade para IgM dos 50 pacientes analisados.

A prevalência de toxoplasmose nos pacientes em hemodiálise em fase aguda, IgM Reagente, indica marcador sorológico, como medida diagnóstica importante para tratamento aos pacientes. A análise dos dados e resultados obtidos não pode ser utilizada para a população em geral devido à limitação do número de amostras.

Os fatores de risco, como ter contato com animais na infância e quando adulto, o tipo de carne consumida, tipo de verdura, como lavava as verduras, se comia salame, que tipo de carne e como realizava o seu cozimento foram fatores descritos que não houve significado estatístico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao setor de Hemodiálise e Laboratório de Análises Clínicas do hospital de Erechim, com sua equipe de médicos, funcionários e aos pacientes pelo carinho e pela ajuda na realização deste trabalho.

Projeto aprovado no Comitê de ética em pesquisa nº098/TCH/06, URI Campus de Erechim/RS.

REFERÊNCIAS

1. AMENDEIRA, M.R.R.; Da COSTA, T.; SPALDING, S.M. Toxoplasma gondii e a toxoplasmose; Ver. Souza Marques; v.1, n.1, p.15-35, 1999.
2. BUTTER, K.T. Infections in renal failure; J Infect Dis; v.12, p.325-328, 1992.
3. CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e diagnóstico; Rev Ass Med Bras; v.46, n.4, p.335-341, 2000.
4. CAMARGO, M.E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A.W, editor. Diagnóstico das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2.ed.Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 279-287, 2001.
5. CARMO, E.L.; SILVA, M.C.M.; XAVIER, U.A.M. Inquérito sorológico de toxoplasmose em candidatos a transplante renal no hospital Ofir Loyola, Belé, Pará, Brasil. Rev Panam Infectol v.4, n.4, p.15-17, 2004.
6. CARVALHO, M.F.C.; SOARES, V.A. Toxoplasmose após transplante renal. Relato de 2 casos; J Bras Nefrol; v.20, n.3, p.286-290, 1998.
7. COELHO, R.A.I.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO, L.B. Prevalence of IgG antibodies specific to Toxoplasma gondii among bloodors in Recife, Northeast Brazil; Rev Inst Med Trop; v.45, n.4, p.229-231, 2003.
8. CUNHA, S.P.; DUARTE, G. Gestação de Alto Risco; Rio de Janeiro, MEDSI, 1998.
9. DA CUNHA, S.; FERREIRA, E.; RAMOS, I.; MARTINS, R.; DE FREITAS, L.; BORGES, J.L.; CÔRTE-REAL, R.; MOTA A.; MELIÇO-SILVESTRE, A.; FURTADO, A.L. Cerebral toxoplasmosis after renal transplantation. Case report and review. Acta Med Port; v.1, n.7, p.61-66, 1994.
10. DUTRA, M.M.D. Toxoplasmose em transplante renal; J Bras Nefrol; v.20, n.3, p.308-309, 1998.
11. FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R(editor). Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu, p. 1290-1304, 1996.
12. KAVAZOE, U. Toxoplasma gondii. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11.ed. São Paulo, Atheneu, p.163-172, 2005.
13. MORAES, R.G.; LEITE, I.C.; GOULART, E.G. Parasitologia e Micologia Humana. 4.ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2000, 191-205 p.
14. NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. 10.ed. São Paulo, Atheneu, 2003, 147-156 p.
15. OCAK, S.; DURAN, N.; ESKIOCAK, A.F.; AYTAÇ, H.A. Anti-Toxoplasma gondii antibodies in hemodialysis patients receiving long-term hemodialysis therapy in Turkey; Saudi Med J; v.26, n.9, p.1378-1382, 2005.
16. PARSLOW, T. G.; STITES, D. P., TERR, A. I.; IMBODEN, J. B. Imunologia Clínica. 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

17. RENOULT, E.; GEORGES, E.; BIAVA, M.F.; HULIN, C.; FRIMAT, L.; HESTIN, D. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: Report of six cases and review; Clin Infect Dis; v.24, p. 625-634, 1997.
18. SILVEIRA, C.A.M. Toxoplasmose: Dúvidas e Controvérsias; Erechim/RS, Edifapes, 2002.
19. YAZAR, S.; GUR, M.; OZDOGRU, I.; YAMAN, O.; OGUZHAN, A.; SAHIN, I. Anti-Toxoplasma gondii antibodies in hemodialysis patients with chronic renal failure; Yonsei Med J, v.44, n.2, p. 288-292, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof.^a Marisa Lúcia Romani Paraboni
Disciplina de Imunologia; Departamento de Ciências da Saúde
URI Campus de Erechim - Av. Sete de Setembro 1621
CEP 99700-000 - Erechim RS
E-mail: marisar@uri.com.br



Excelência de Conhecimento em Diagnóstico Laboratorial



CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU:

ANÁLISES CLÍNICAS
HEMATOLOGIA CLÍNICA
MICROBIOLOGIA CLÍNICA
CITOLOGIA CLÍNICA
GESTÃO EM LABORATÓRIO CLÍNICO



CURSOS DE TREINAMENTO PROFISSIONAL:

MICROBIOLOGIA
HEMATOLOGIA
IMUNOLOGIA

INFORMAÇÕES E INSCRIÇÕES:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Rua Vicente Licínio,99 Tijuca
Rio de Janeiro - RJ CEP: 20.270-902

Fone: 21 2187 - 0800
Fax: 21 2187 - 0805

Site: www.sbac.org.br
E-mail: cpg@sbac.org.br

Estudo comparativo da eficiência da eletroforese alcalina em acetato de celulose na identificação de hemoglobinas utilizando diferentes tampões*

Comparative study of the alkaline electrophoresis on cellulose acetate efficiency to identify hemoglobins by using different buffers

Flávio Silva de Carvalho¹, Karlla Greick Batista Dias-Penna², Érica Silva de Araujo³,
Andréa Luciana Martins Ramos³ & Luiz Artur Mendes Bataus⁴

RESUMO - As hemoglobinas podem apresentar alterações moleculares denominadas hemoglobinopatias caracterizadas pela ineficiência da produção das cadeias de globinas (alfa ou beta) ou por alterações estruturais na síntese destas cadeias. Tais alterações estruturais promovem a formação de hemoglobinas variantes (anômalas) e o desbalanceamento na síntese destas cadeias tem como consequência a talassemia. O diagnóstico das hemoglobinopatias é realizado essencialmente por avaliação eletroforética. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes tampões de eletroforese na caracterização de hemoglobinas variantes por meio da técnica de eletroforese alcalina em acetato de celulose. Considerando as características de separação e nitidez das bandas obtidas concluímos que o tampão TEB (Tris base 0,090 M, Ácido Bórico 0,090 M, EDTA 0,002 M, pH 8,2), na concentração de 0,5X foi o mais eficiente na caracterização das hemoglobinas testadas. Este tampão além de permitir uma melhor separação eletroforética entre as diferentes hemoglobinas, também permitiu uma maior estabilidade da hemoglobina H, favorecendo a identificação mais eficaz dessa hemoglobina instável.

PALAVRAS-CHAVE - hemoglobinas; perfil eletroforético, hemoglobinas variantes.

SUMMARY - Hemoglobins could present molecular alterations called hemoglobinopathies which are characterized by the inefficient production of globin chain (alpha or beta) or by the structural changes on the synthesis of these chains. This structural changes result in the formation of variants (abnormal) hemoglobin and the inefficient production results on unbalanced formation of hemoglobin that consequently results in thalassemias. The diagnoses of hemoglobinopathies are made essentially by electrophoresis. The aim of this work is evaluate the influence of different electrophoresis buffers in the characterization of variant hemoglobin on alkaline electrophoresis by cellulose acetate. Considering the characteristics of separation and sharpness of the bands, we conclude that the buffer TEB (Tris base 0,090 M, Boric acid 0,090 M, EDTA 0,002 M, pH 8,2) at 0,5X concentration is the most efficient in characterization of hemoglobin's tested. This buffer allows the better electrophoresis migration of different hemoglobin, and it also allows more stability of hemoglobin H, favoring more efficient identification of this instable hemoglobin.

KEYWORDS - hemoglobin; electroforetic profile; hemoglobin variants.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) humana é formada por quatro subunidades, composta de dois pares de cadeias globínicas, conhecidas por cadeia alfa e beta. A cada uma destas cadeias está ligado um grupo heme que efetivamente tem a capacidade de ligar, transportar e liberar moléculas de O₂ e CO₂ através do organismo¹⁴.

No adulto, os genes do cromossomo 11 são responsáveis pela síntese das cadeias de globina tipo beta (beta, delta e gama) que possuem 146 aminoácidos, enquanto os genes do cromossomo 16 são responsáveis pela síntese das cadeias alfa, as quais possuem uma sequência de 141 aminoácidos. Assim, as hemoglobinas normais produzidas após o nascimento são: hemoglobina A (Hb A) composta por duas cadeias alfa e duas beta ($\alpha_2\beta_2$), que é a predominante (96 a 98%); hemoglobina A₂ (Hb A₂), duas cadeias alfa e duas delta ($\alpha_2\delta_2$) (02 a 04%) e a hemoglobina fetal (Hb F), composta por duas cadeias alfa e duas gama ($\alpha_2\gamma_2$) (0 a 1%)¹⁰.

As hemoglobinopatias aparecem em decorrência de alterações nos genes que codificam as cadeias globínicas alfa e/ou beta, sendo que estas alterações podem ser qualitativas, nos genes estruturais, resultando no aparecimento de

hemoglobinas variantes ou quantitativas, nas regiões reguladoras, resultando nas talassemias^{17,19}.

Estudos revelam que cerca de 7,0% da população mundial seja portadora de um dos tipos de hemoglobinopatia justificando a importância da identificação destas alterações correlacionando a estrutura, função, aspectos genéticos, antropológicos e as consequências clínicas do indivíduo homocigoto ou heterocigoto^{5,15,18}. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no Brasil, a hemoglobina S, a hemoglobina C e a talassemia beta são suficientes para causar um alto grau de morbidade e de mortalidade¹⁶. No site Globin Gene Server⁷ estão depositados os dados dos genes envolvidos na produção das hemoglobinas, nele estão descritas atualmente 997 mutações que resultaram em diferentes hemoglobinas variantes.

As hemoglobinas variantes surgem de alterações qualitativas nos genes estruturais, geralmente em decorrência de mutações pontuais, ou seja, alterações de único nucleotídeo que por consequência poderá formar uma molécula de hemoglobina com características físico-químicas diferentes. Esta substituição pode alterar a carga elétrica da hemoglobina, permitindo sua identificação por metodologias de separação eletroforéticas³.

Recebido em 28/01/2009

Aprovado em 19/04/2010

*Universidade Federal de Goiás – UFG – Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética - Goiânia – GO

Endereço: Campus Samambaia, Instituto de Ciências Biológicas 2, sala 203. CEP:74001-970.

Apoio Financeiro: Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), FUNAP/UFG, FAPEG

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia e Bolsista de Iniciação Científica; ² Biomédica, Docente da UCG/GO e Doutoranda do Programa de doutorado em Biologia Celular e Molecular da UFG; ^{2,3} Acadêmicas do Curso de Biomedicina UCG/GO; ⁴ Biólogo e Docente da UFG/GO.

Para a investigação preliminar das hemoglobinas variantes emprega-se a eletroforese em acetato de celulose utilizando tampão alcalino, por ser uma técnica rápida e de baixo custo. Cadeias globínicas mutantes que diferem das cadeias normais em sua carga elétrica total são rapidamente diferenciadas. Utiliza-se o acetato de celulose como suporte para a eletroforese, pois as hemoglobinas são preferencialmente separadas com base em suas cargas, pois a fricção destas proteínas com o suporte é pequena, o que faz com que o tamanho da molécula não influencie profundamente a sua velocidade de migração⁹.

Entretanto, um grande número de variantes com significado clínico apresenta substituições que não alteram a carga da proteína. Além disso, algumas mutações podem causar alterações na estrutura tridimensional da molécula. Algumas variantes possuem migração eletroforética idênticas - co-migram - como é o caso das Hb A2, C, O e E e Hb S, D e G. Sendo assim, a sensibilidade da técnica de eletroforese é limitada, sendo necessários testes complementares^{3,4}.

A proposta desse trabalho é estudar o efeito da variação da concentração, composição e valor de pH de diferentes tampões de eletroforese, na caracterização das principais hemoglobinas, utilizando eletroforese alcalina em acetato de celulose.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, cumprindo-se os princípios éticos estabelecidos na Resolução n° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O trabalho é parte de um projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG sob protocolo 065/2005. As amostras foram coletadas de adultos de ambos os sexos após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram analisadas amostras de sangue total, coletadas com EDTA provenientes de indivíduos previamente identificados como portadores de Hb A, S, C ou H utilizando a metodologia de eletroforese alcalina em acetato de celulose (Dolles®), segundo NAOUM¹¹. A presença das hemoglobinas A, S e C foram confirmados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com o equipamento Variant I da BioRad®. Enquanto que a Hb H foi confirmada pela pesquisa intra-eritrocitária de Hb H utilizando o corante azul de crezil brilhante¹³.

Para a realização do estudo comparativo entre os diferentes tampões de eletroforese de hemoglobinas, as amostras foram previamente hemolisadas com uma solução de saponina à 1,0%¹¹. O tempo para a separação das hemoglobinas foi padronizado em 40 minutos utilizando 300 Volts, exceto na análise da Hb H, cujo tempo foi de dez minutos.

Na tabela 01 estão descritos os tampões utilizados, seus componentes e suas respectivas concentrações.

TABELA I

Descrição dos componentes dos tampões de eletroforese, com suas respectivas concentrações e valor de pH.

TAMPÃO	REFERÊNCIA	TRIS base	ÁCIDO BÓRICO	EDTA	pH
TEB n°1	NAOUM, 1999 ¹¹	0,084 M	0,052 M	0,002 M	8,5
TEB n°2	MARENGO-ROWE, 1965 ⁹	0,120 M	0,015 M	0,005 M	8,9
TEB n°3	MANIATIS <i>et al</i> , 1989 ⁸	0,090 M	0,090 M	0,002 M	8,2

A eficiência do tampão MARENGO-ROWE⁹ foi avaliada utilizando diferentes valores de pH. Os tampões foram ajustados para pH: 7,8, 8,0, 8,4 e 9,0.

O tampão segundo MANIATIS⁸, foi utilizado em diferentes concentrações, podendo estar mais diluído ou mais concentrado que o tampão original (1,0X), variando de 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,65X, 0,80X, 1,5X a 2,0X.

Outro tampão utilizado foi o Tris-glicina, segundo MANIATIS⁸, preparado numa concentração de Glicina à 0,019M e Tris (hidroximetilaminometano) à 0,025M. Este tampão foi ajustado em pH 8,7 e utilizado nas concentrações de 0,5X e 1,0X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho foi avaliar a separação eletroforética entre as hemoglobinas A, S e C por meio da eletroforese em acetato de celulose, utilizando o tampão TEB n°1 (figura 01). Foram utilizadas amostras de indivíduos previamente testadas e confirmadas por cromatografia em HPLC. Essas hemoglobinas foram escolhidas por serem as mais prevalentes na população brasileira. Neste trabalho este tampão foi utilizado como referência por ser muito utilizado nos ensaios laboratoriais para diagnóstico das hemoglobinopatias^{1,6,12}.

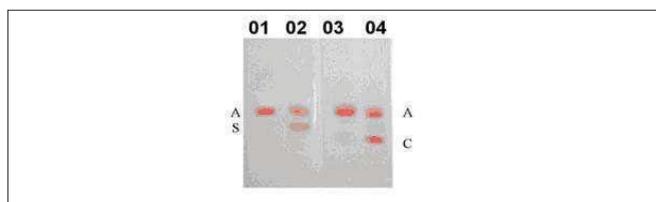


Figura 01 – Perfil eletroforético em acetato de celulose utilizando o tampão TEB n°1. Raia 01 perfil AA; raia 02 perfil AS; raia 03 perfil AA e raia 04 perfil AC.

Na figura 01 observa-se que a separação das Hb A, S e C é bastante evidente utilizando a técnica de eletroforese em acetato de celulose com o tampão TEB n°1.

A avaliação da separação eletroforética utilizando o tampão TEB n°2 ajustado para os pH 7,8; 8,0; 8,9 e 9,0 pode ser observada na figura 02. Nela é facilmente visualizado que nos menores valores de pH (7,8 e 8,0) praticamente não ocorreu separação das hemoglobinas testadas. Utilizando o pH 8,9 e 9,0 é notado uma pequena separação das diferentes hemoglobinas. Sendo que a melhor separação foi obtida com o tampão em pH 9,0. O trabalho original de MARENGO-ROWE⁹ descreve o tampão ajustado para o valor de pH 8,9 como efetivo. Pode se inferir deste resultado a importância de novos estudos relacionados à variação da concentração e pH dos tampões, no aprimoramento da identificação das hemoglobinas.

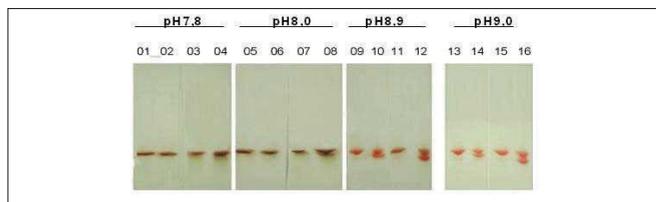


Figura 02 – Perfil eletroforético em acetato de celulose utilizando o tampão TEB n°2 nos pH 7,8, 8,0, 8,9 e 9,0. Raias 01, 03, 05, 07, 09, 11, 13 e 15 perfil AA, raias 02, 06, 10 e 14 perfil AS, raias 04, 08, 12 e 16 perfil AC.

O padrão de migração eletroforética utilizando o tampão TEB n°3 em diferentes concentrações é mostrado na figura 03. Pode-se observar que à medida que a concentração dos componentes do tampão aumenta ocorre uma diminuição na separação das hemoglobinas. A maior migração eletro-

forética foi obtida com o tampão na concentração 0,3X, entretanto nessa condição ocorreu uma perda de nitidez na visualização dos perfis eletroforéticos. A utilização do tampão 0,5X resultou em uma menor separação eletroforética em comparação com o 0,3X, porém as bandas obtidas foram mais definidas (figura 03).

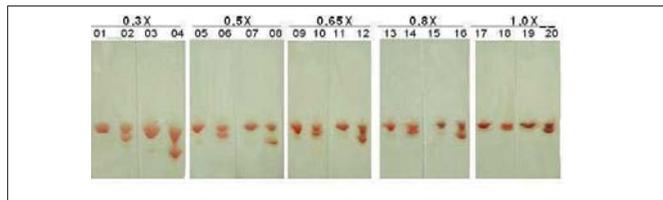


Figura 03 – Perfil eletroforético em acetato de celulose utilizando o tampão TEB nº3 nas concentrações 0,3X, 0,5X, 0,65X, 0,8X e 1,0X. Raias 01, 03, 05, 07, 09, 11, 13, 15, 17 e 19 perfil AA, raias 02, 06, 10, 14 e 18 perfil AS, raias 04, 08, 12, 16 e 20 perfil AC.

Para efeito de comparação da eficiência da separação das hemoglobinas utilizando os diferentes tampões, foram medidas as distâncias (em centímetro) entre o ponto de aplicação das amostras e o ponto de migração de cada hemoglobina.

TABELA II
Diferença entre as distâncias de migração eletroforética das hemoglobinas, utilizando os tampões TEB nº1 e TEB nº2.

TAMPÃO	pH	HbA*	HbC*	DIFERENÇA ENTRE HbA e C**	HbA*	HbS*	DIFERENÇA ENTRE HbA e S**
TEB nº1	8,5	3,0	2,0	1,0	3,6	3,0	0,6
TEB nº2	7,8	2,2	2,2	0,0	1,8	1,8	0,0
TEB nº2	8,0	3,0	3,0	0,0	3,0	3,0	0,0
TEB nº2	8,9	3,7	3,0	0,7	3,9	3,4	0,5
TEB nº2	9,0	3,3	2,7	0,6	4,2	3,8	0,4

*média da distância de migração em cm (realizado em triplicata)

**diferença entre a distância de migração em cm (realizado em triplicata)

Na tabela 02, observamos uma maior separação eletroforética entre as hemoblobinas utilizando o tampão TEB nº1 quando comparado com os tampões TEB nº2 independente do pH testado. É muito importante ressaltar que o TEB nº1 é resultado de estudos de aprimoramento do tampão MARENGO-ROWE⁹ descritos por NAOUM¹¹. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados descritos por NAOUM¹¹ mostrando a importância de aprimorar a metodologia de eletroforese no estudo e caracterização das hemoglobinas variantes.

TABELA III
Diferença entre as distâncias de migração eletroforética das hemoglobinas utilizando os tampões TEB nº1 e TEB nº3.

TAMPÃO	HbA	HbC	DIFERENÇA ENTRE HbA e C	HbA	HbS	DIFERENÇA ENTRE HbA e S
TEB nº1	3,0	2,0	1,0	3,6	3,0	0,6
TEB nº3 (0,3X)	3,0	1,0	2,0	3,0	2,0	1,0
TEB nº3 (0,5X)	3,4	2,3	1,1	3,4	2,6	0,8
TEB nº3 (0,65X)	3,0	2,0	1,0	3,0	2,3	0,7
TEB nº3 (0,8X)	3,4	2,6	0,8	3,2	2,8	0,4
TEB nº3 (1,0X)	2,7	2,2	0,5	3,0	2,6	0,4

*média da distância de migração em cm (realizado em triplicata)

**diferença entre a distância de migração em cm (realizado em triplicata)

A tabela 03 mostra que o tampão TEB nº3 na concentração

0,3X foi o que apresentou maior separação eletroforética, entretanto as bandas formadas não eram muito bem definidas (figura 03). Utilizando o tampão 0,5X observa-se uma diminuição na separação eletroforética, quando comparado com a separação obtida pelo tampão 0,3X (tabela 03). Entretanto, observa-se uma melhor nitidez das bandas formadas (figura 03). A separação eletroforética das hemoglobinas avaliadas utilizando o tampão TEB nº3 na concentração 0,3X e 0,5X foram maiores que a obtida utilizando o tampão de referência TEB nº1.

Essa maior separação das bandas obtidas com o tampão TEB nº3 (0,3X e 0,5X) permite supor que estes tampões seriam bastante eficientes na separação de outras hemoglobinas que possuem co-migração ou migração relativa muito próxima de outras hemoglobinas. No trabalho de BERTHOLO & MOREIRA² é mostrado uma tabela com o padrão eletroforético de diferentes hemoglobinas. As hemoglobinas S, D Punjab e G Filadelfia apresentam o mesmo perfil de migração eletroforética. O mesmo acontece com as hemoglobinas C e E. As Hb Porto Alegre (β^9), Hb K Woolwich (β^{132}) apresentam migração semelhante a Hb A. A utilização do tampão TEB nº3 (0,5 X) poderia auxiliar na obtenção de um padrão de migração eletroforética mais distinto para estas hemoglobinas.

Nesse trabalho, também foi estudada a migração eletroforética da hemoglobina H, bem como sua instabilidade nos tampões utilizados. Foram utilizados os tampões TEB nº1 e TEB nº3 na concentração de 0,5X, pois estes apresentaram um melhor desempenho na separação das hemoglobinas testadas. Nessa avaliação também foi incluído o tampão Tris-glicina.

A eletroforese foi avaliada após o período de dez minutos de migração para observar a presença da banda de Hb H¹¹. A figura 04 mostra que a Hb H é mais estável quando a eletroforese é realizada no tampão TEB nº3 0,5X, quando comparada com outros tampões. As setas indicam a posição da banda relativa à Hb H. Foram utilizadas três amostras caracterizadas previamente com o perfil eletroforético AH, e foram confirmadas pela pesquisa intra-eritrocitária de Hb H através da coloração com azul de crezil brilhante¹³.

A hemoglobina H é formada por um tetrâmero de cadeias do tipo beta, o que a torna uma hemoglobina instável. Na eletroforese alcalina em acetato de celulose a Hb H migra mais rapidamente que a Hb A. Entretanto devido a sua instabilidade ela só é visualizada no início da eletroforese. Neste trabalho foi adotado o tempo de dez minutos para visualização da Hb H, conforme sugere NAOUM¹¹.

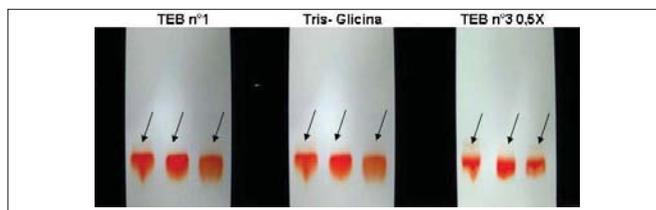


Figura 04 – Perfil eletroforético em acetato de celulose utilizando os tampões TEB nº1, Tris-glicina 0,5X e TEB nº3 0,5X. A seta indica Hb H e logo abaixo a banda correspondente à Hb A.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a eficiência da técnica de eletroforese alcalina em acetato de celulose sofre influência do tampão utilizado. Os resultados obtidos mostraram que o tampão TEB nº3 (Tris base 0,090 M, Ácido Bórico 0,090 M, EDTA 0,002 M, pH 8,2) na

concentração de 0,3X foi o que apresentou maior separação entre as hemoglobinas A, S e C. Entretanto, apesar da maior separação as bandas eram menos nítidas. Este tampão além de apresentar uma maior separação das hemoglobinas em relação ao tampão de referência, apresentou uma melhor nitidez das bandas formadas quando comparado com o resultado obtido com o mesmo tampão na concentração 0,3X.

Considerando as características de separação e nitidez das bandas obtidas concluímos que o tampão TEB nº3 na concentração de 0,5X é o mais eficiente na caracterização das hemoglobinas testadas. Este tampão além de permitir uma melhor caracterização eletroforética entre as diferentes hemoglobinas, também permitiu uma maior estabilidade da Hb H, favorecendo a identificação mais eficaz dessa hemoglobina instável.

Vale a pena ressaltar que devido a grande diferença de migração entre as Hb A, S e C é importante a realização de experimentos de caracterização de outras hemoglobinas utilizando o tampão TEB nº3 0,3X. Como ele permitiu uma maior migração eletroforética tal característica poderia ser útil na separação e caracterização de outras hemoglobinas variantes com pequenas diferenças no perfil eletroforético ou até aquelas que co-migram.

AGRADECIMENTOS

Flávio Silva de Carvalho bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), à FAPEG pelo auxílio Edital I/2007 e à FUNAPE/UFG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. BANDEIRA, F. M. G. C.; LEAL, M. C.; SOUZA, R. R. et al. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. Rev. Bras. Saude Mater. Infant., v. 3, n. 3, p.265-270, 2003.
2. BERTHOLO, I. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. J. Bras. Patol. Med. Lab. v.42, n.4, p.245-251, 2006.
3. CHINETATO-FERNADES, A. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. Rev. Bras. Hematol. e Hemot., v.28, n.1, p.65-70, 2006.
4. DACIE, J. V. & LEMIS, S. M. 1995. Practical Haematology. 8ª Ed. Churchill Livingstone. London. 609 p.

5. EASTMAN, J. W. et al. Distribution of hemoglobin F, A, S, C, E and D quantities in 4 million newborn screening specimens. Clin. Chem. v.45, n.5, p.683-685, 1999.
6. FERNADES, A. R. C. et al. Avaliação eletroforética, cromatográfica e molecular da Hb D Los Angeles no Brasil. Rev. Bras. Hematol. e Hemot., v.25, n.3, p.161-168, 2003.
7. GLOBIN GENE SERVER. Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em: 13 de outubro de 2008.
8. MANIATIS, T.; SAMBROOK, J. & FRITSCH, E. F. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. Cap.6.
9. MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. J. Clin. Path. v.18, p.790-792, 1965.
10. NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. 1a ed. Sarvier, São Paulo, 1997.
11. NAOUM, P. C. Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos. 2a ed. Santos Livraria Editora, São Paulo, p.154, 1999.
12. ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.22, n.2, p.111-121, 2000.
13. PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATONYANNOPOULOS, G. Stains form inclusions bodies. In "Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies." Atlanta: Hew publications, 1974.
14. PRATT, C. W. & CORNELLY, K. Bioquímica Essencial. 1 a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.117-123, 2006.
15. SCHNEIDER, R. G. et al. Abnormal hemoglobins in a quarter million people. Blood, v.48, n.5, p.629-637, 1976.
16. RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A. & PAIVA-E-SILVA, R. B. A Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. Cad. Saude Publ. v.19, n.4, p.1195-1199, 2003.
17. WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. The Thalassemia Syndromes. 4ª ed. Blackwell Science Publications, 2001(a).
18. WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. WHO. v.79, n.8, p.704-712, 2001(b).
19. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. 1 ed. Ed São Paulo: Atheneu, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus
Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética.
Campus Samambaia, ICB 2, sala 203
CEP74001-970 Goiânia – Goiás.
e-mail: bataus@icb.ufg.br
Fone (062) 35211493



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica do polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill)* *in vivo*

Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) *in vivo*

Thiago Belchior de Oliveira¹, Kátia Aparecida Aguiar Salazar¹, Stella Maris da Silveira Duarte²,
Denise Aparecida Corrêa Moreira³ & Fernanda Borges Araújo de Paula²

RESUMO - O estresse oxidativo relaciona-se com doenças como aterosclerose, diabetes e câncer. É provável que o desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes seja um dos fatores causadores ou agravantes dessas doenças. Estudos epidemiológicos também relacionam o câncer com dieta inadequada, apresentando atenção especial aos danos no DNA. A fruta-do-lobo é uma planta do cerrado brasileiro usada popularmente como hipoglicemiante, hipocolesterolêmico e controle da obesidade. Devido à presença de consideráveis teores de ácido ascórbico e compostos fenólicos na fruta-do-lobo e ação destes compostos como antioxidantes, este trabalho objetivou avaliar o potencial antioxidante, antimutagênico e possível toxicidade do polvilho de lobeira pela determinação da peroxidação lipídica, teste do micronúcleo de eritrócitos de medula óssea e determinação dos parâmetros hematológicos. A ingestão do polvilho de lobeira nas concentrações 450, 850 e 1300 mg/kg não interferiu na peroxidação lipídica em cérebro de ratas. Analisando-se os parâmetros hematológicos, houve alteração significativa entre o controle positivo e negativo quanto a leucócitos e linfócitos. Entre grupos tratados com lobeira e ciclofosfamida+lobeira, não se observou prevenção significativa contra os efeitos mutagênicos da ciclofosfamida. Pelo teste do micronúcleo as soluções de polvilho de lobeira não apresentaram efeito genotóxico ou citotóxico, assim como também não protegeram as células contra o efeito mutagênico.

PALAVRAS-CHAVE - Fruta-de-lobo, lobeira, antioxidantes, antimutagênico, parâmetros hematológicos.

SUMMARY - The oxidative stress is related with diseases as atherosclerosis, diabetes and cancer. It is probable that the unbalance between free radicals and antioxidants is one of the factors causing the aggravating of these illnesses. Epidemiologic studies also relate the cancer with inadequate diet, presenting special attention to the damages in the DNA. The fruta-do-lobo is a plant of the cerrado Brazilian popularly used as hypoglycemic, hypocholesterolemic and obesity control. The presence of tenors considerable of ascorbic acid and phenolic compounds in the fruta-do-lobo and the action of these compounds as antioxidants, this research objectified to evaluate the potential antioxidant, antimutagenic and possible toxicity of polvilho-de-lobeira for the determination of the lipidic peroxidation, test of the micronucleus of red cells of bony marrow and determination of the hematologic parameters. The ingestion of polvilho-de-lobeira in the concentrations of 450, 850 and 1300 mg/kg did not interven the lipidic peroxidation in brain rats. Analyzing the hematologic parameters, it had significant alteration between the positive and negative control in relation as the leukocytes and lymphocytes. Between groups lobeira and ciclofosfamida+lobeira, did not observe prevention significant against the mutagenic effects of the ciclofosfamida. For the test of the micronucleus the solutions of polvilho-de-lobeira had not presented genotoxic or cytotoxic effects, as well as they had also not protected the cells against the mutagenic effect.

KEYWORDS - Fruta-do-lobo, lobeira, antioxidants, antimutagenic, hematologic parameters.

INTRODUÇÃO

A fruta-de-lobo ou lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill), um vegetal pertencente à família *Solanaceae*, cresce e se desenvolve em condições ambientais desfavoráveis tais como terras áridas e pobres em nutrientes. É capaz de suportar clima árido e períodos de seca prolongados, resistindo ainda a ciclos anuais de queimadas feitas pelo homem. É encontrada nas vegetações do tipo campo sujo, cerrado e cerradão (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2003). Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste é difundido o uso do polvilho de lobeira, um pó extraído da moagem ou trituração da polpa do fruto da lobeira, o qual pode ser de obtenção doméstica ou adquirido em farmácias especializadas em fitoterápicos sob a forma de cápsulas (FERREIRA, 2005). É utilizado na medicina popular como hipoglicemiante, no tratamento da obesidade e na redução do colesterol (CRUZ, 1985). Estudos realizados por Dall'Agnol, Lino Von Poser, em 2000, constataram a presença de pectina, mucilagem e amido no polvilho da lobeira. Em 2006, Rocha constatou a presença de compostos fenólicos. Oliveira Júnior, em 2003, relatou a presença de ácido ascórbico na fruta do lobo, considerando que se estiver na forma de ascorbato, de acordo

com Kalt em 1999, não irá contribuir substancialmente para a capacidade antioxidante.

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais, dentre eles os compostos fenólicos, têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido à sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres. (BROINIZI, 2007). Para proteger a célula e os órgãos do corpo contra as espécies reativas de oxigênio (ERO), os sistemas biológicos desenvolveram um sistema antioxidante baseado em uma variedade de componentes enzimáticos, moléculas pequenas e o sistema de quelatação de metais que funcionam interativa e sinergicamente para neutralizar as ERO (JACOB, 1995). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são resultantes da redução parcial do oxigênio na cadeia respiratória, e esse termo engloba moléculas contendo oxigênio altamente reativas, sendo caracterizadas como radicais livres aquelas que apresentam um elétron desemparelhado, (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Entre os antioxidantes endógenos estão as enzimas (superóxido dismutase,

Recebido em 04/02/2009
Aprovado em 27/08/2010

*Trabalho desenvolvido nos Departamentos de Análises Clínicas e Toxicológicas e no Departamento de Ciências Exatas da UNIFAL-MG.

¹Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG); ²Docentes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UNIFAL-MG; ³Docente do Departamento de Ciências Exatas da UNIFAL-MG.

glutaciona peroxidase e catalase) e proteínas que se ligam a metais (ferritina, lactoferrina, albumina e ceruloplasmína), (DUTHIE & BROWN, 1994).

O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais têm aumentado, principalmente para prevenir o dano hepático às células vivas. Em contrapartida, o uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, (MANCINI-FILHO, 2001). O balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese, (WEISBURGER, 1999; WETTASINGHE *et al.*, 2002).

Está bem documentado que a dieta tem um papel crucial na etiologia do câncer humano. Esforços têm sido feitos para identificar substâncias protetoras (antimutagênicos e anticarcinogênicos) em alimentos. Embora numerosos estudos tenham sido publicados, é problemático usar estes resultados para o desenvolvimento de estratégias nutricionais, devido ao uso de modelos *in vitro*, genotoxinas e carcinógenos que não são relevantes para humanos, falta de conhecimento sobre dose-efeito dos constituintes dietéticos protetores do DNA, entre outros, (KNASMÜLLER *et al.*, 2002).

Os componentes regularmente presentes nos alimentos que possuem efeitos preventivos para o câncer ou benéficos para outras patologias são chamados de quimiopreventivos, sendo, muitos deles, antioxidantes (STAVRIC, 1994). Os alimentos contendo agentes para quimioprevenção constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos, (BLOCH; THOMSON, 1995).

Quanto à ação tóxica do polvilho de lobeira no organismo, existem contradições, Ferreira (2005) sugeriu não haver relação entre o consumo do amido de lobeira e danos à função renal. No entanto, Chang *et al.* (2002) observaram alterações como degeneração e necrose glomerular e tubular em animais tratados com polvilho de lobeira.

Schwarz *et al.* (2005) demonstraram toxicidade no útero e durante a lactação para ratas expostas à fruta-de-lobo.

De acordo com Maruo *et al.*, (2003), outros estudos deverão ser realizados para investigar o efeito tóxico do polvilho de lobeira em fêmeas, pois em seu experimento foi observada uma redução do peso de órgãos como útero e fígado, porém nenhuma alteração foi observada em machos.

Outro dado importante apresentado por Chang *et al.*, (2002), é a possibilidade da solução de polvilho de lobeira administrada a ratas grávidas ser tóxica para o feto, causando redução da placenta, pulmões e rins.

O teste do micronúcleo fornece dados sobre a citotoxicidade e/ou clastogenicidade. A diferenciação do eritroblasto leva à formação de eritrócito, célula anucleada. O eritrócito imaturo (RNA positivo) está em um estágio intermediário de desenvolvimento, apresenta ribossomos, portanto, é policromático (PCE). O eritrócito maduro (RNA negativo) não apresenta ribossomos, portanto é normocromático (NCE). O aumento de eritrócitos micronucleados (MNE) indica danos cromossômicos. O aumento de MNE (eritrócitos micronucleados) indica efeito citotóxicos com morte de células jovens ou diminuição da proliferação celular (RIBEIRO, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos

Os frutos utilizados foram coletados nas pastagens ao redor da cidade de Alfenas – MG. Escolheu-se frutos com casca da cor verde, pedúnculo totalmente preso e ausência de injúrias provocadas por insetos ou choques mecânicos.

Foram utilizados 48 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando 270 ± 20 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

Extração do polvilho de lobeira

Os frutos foram lavados, descascados e suas polpas picadas e colocadas em um recipiente contendo 5 litros de água destilada e 0,5 mL de ácido acético glacial, para evitar a oxidação. A polpa foi homogeneizada em liquidificador durante 1 minuto, com água destilada, filtrada em tecido de algodão e prensada para garantir que toda a amostra passasse pelo filtro. O filtrado foi colocado em um bquer e levado para um refrigerador (4-8°C) para decantar por 16 horas.

Após a decantação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com água destilada e colocado para decantar novamente no refrigerador, por 6 horas, (ROCHA, 2006). O sobrenadante foi desprezado e observou-se a formação de uma fração escura que foi sendo lavada e desprezada até tornar-se clara. O polvilho foi submetido à filtração a vácuo e posteriormente à secagem, à pulverização e ao armazenamento (FERREIRA, 2005).

Tratamento experimental *in vivo*

Os animais incluídos do experimento biológico foram divididos em oito grupos e tratados segundo o protocolo expresso no quadro 1.

Grupos experimentais	Tratamento
Grupo controle negativo	06 animais receberão solução controle (água)
Grupo lobeira 1	06 animais receberão solução de 450mg/kg de polvilho de lobeira
Grupo lobeira 2	06 animais receberão solução de 850mg/kg de polvilho de lobeira
Grupo lobeira 3	06 animais receberão solução de 1300mg/kg de polvilho de lobeira
Grupo controle positivo	06 animais receberão ciclofosfamida 24h antes do teste
Grupo lobeira 1+ciclo	06 animais receberão solução de 450mg/kg de polvilho de lobeira e ciclofosfamida 24h antes do teste
Grupo lobeira 2+ciclo	06 animais receberão solução de 850mg/kg de polvilho de lobeira e ciclofosfamida 24h antes do teste
Grupo lobeira 3+ciclo	06 animais receberão solução de 1300mg/kg de polvilho de lobeira e ciclofosfamida 24h antes do teste

Quadro 1. Divisão dos animais em grupos de acordo com a dose a ser administrada.

O período do experimento foi de 18 dias, durante o qual os animais foram tratados por gavagem uma vez ao dia.

Ao final desse período, os animais foram anestesiados sob inalação de éter, colheu-se o sangue por punção cardíaca e com o aprofundamento da anestesia foram submetidos à eutanásia. Retirou-se o cérebro e o fêmur, este, para a extração da medula óssea.

Obtenção dos homogeneizados de cérebro

Após o sacrifício por inalação de excesso de éter, os cérebros foram pesados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos, em banho de gelo, após a adição de PBS 0,1M, pH 7,2 (volume equivalente a 4 vezes o peso fresco de tecido). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante mantido em banho de gelo. (JONES *et al.*, 1995)

Determinação da peroxidação lipídica *in vivo*

A peroxidação foi determinada pela medida dos produtos de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por WINTERBOURN et al. (1981). A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano). Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/g de proteína (BROWN & KELLY, 1996).

Determinação de Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram determinados em contador eletrônico de células (Coulter – 780), em sangue total, utilizando-se EDTA como anti-coagulante (DUARTE, 2004).

Teste do Micronúcleo de Eritrócitos de Medula Óssea

As soluções de polvilho de lobeira foram administradas aos animais por gavagem, uma vez ao dia, por 17 dias. A ciclofosfamida foi administrada por gavagem, 24 horas antes da eutanásia. Decorrido o tempo, os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de excesso de éter. O fêmur do membro posterior direito foi retirado, limpo e suas epífises foram cortadas. A medula óssea foi retirada introduzindo-se no canal medular a agulha de uma seringa com 3 mL de soro bovino fetal. Após a centrifugação por 5 minutos, a 1000 rpm, o precipitado foi suspenso em 0,5 mL de soro fetal bovino e os esfregaços foram preparados. Após 24 horas, as lâminas foram coradas com coloração de May-Grunwald e Giemsa em preparação permanente. Foram analisadas 2000 células por animal e a frequência de PCE, NCE, NME foram determinadas, bem como a relação PCE/NCE (RIBEIRO et al., 2003).

Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados por análise de variância pelo teste one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A relação existente entre o estresse oxidativo e a fisiopatologia de doenças crônicas como aterosclerose, diabetes e câncer, impele os pesquisadores a buscar compostos antioxidantes. Estes, por sua vez, podem ser naturais ou sintéticos, sendo que os antioxidantes advindos de fontes naturais como frutas, verduras e especiarias são atualmente fonte de inúmeras pesquisas. Englobada por este cenário, está a fruta-de-lobo ou lobeira, objeto desta pesquisa, que comprovadamente contém alto teor de ácido ascórbico e compostos fenólicos, ambos, compostos antioxidantes, (Rocha, 2006; Oliveira Júnior et al., 2003). Além disso, devido à crença popular da toxicidade deste fruto para animais, avaliou-se também sua interferência nos parâmetros hematológicos e no teste de micronúcleo de eritrócitos de ratas.

Inibição da peroxidação lipídica *in vivo*

Após o tratamento oral das ratas com solução de polvilho de lobeira, os dados da inibição da peroxidação lipídica foram obtidos como se observa na tabela 1.

TABELA I

Valores médios e desvio padrão de TBARS (nM MDA/mg proteína) de homogenato de cérebro de ratas.

Tratamento (17 dias)	TBARS (nM MDA.mg ⁻¹ proteína)
Controle	3,185 ± 1,433
grupo lobeira 450mg.kg ⁻¹	4,695 ± 1,237
grupo lobeira 850mg.kg ⁻¹	5,027 ± 1,624
grupo lobeira 1300mg.kg ⁻¹	4,832 ± 2,911

Parâmetros hematológicos

TABELA II

Parâmetros hematológicos de ratas, após a ingestão da solução aquosa de polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) por 18 dias nas diferentes concentrações (450 mg/kg, 850 mg/kg e 1300 mg/kg) e das ratas tratadas com ciclofosfamida. Os valores expressam a média ± desvio padrão da média.

Parâmetros	Controle	450 mg/kg	850 mg/kg	1300 mg/kg	Controle positivo	Ciclo + 450	Ciclo + 850	Ciclo + 1300
Hm (10 ⁶ /mm ³)	7,8±0,4 a	7,9±0,22 a	7,9±0,25 a	7,8±0,37 a	7,9±0,31 a	8,0±0,30 a	8,0±0,14 a	8,1±0,28 a
Hb (g/dL)	13,9±0,3 a	13,8±0,5 a	14,0±0,6 a	13,4±0,7 a	13,1±0,6 a	13,4±0,3 a	13,3±1,0 a	13,8±0,9 a
Ht (%)	43,7±1,9 a	44,2±1,6 a	45,2±1,9 a	43,7±1,5 a	44,2±1,9 a	44,9±1,4 a	43,7±1,1 a	45,3±1,0 a
VCM (fL)	56,1±2,0 a	55,8±1,4 a	57,1±1,0 a	56,2±1,4 a	55,7±1,0 a	56±0,8 a	54,8±0,9 a	56,1±0,9 a
HCM (pg)	17,2±1,0 a	17,3±0,3 a	17,7±0,3 a	16,0±3,1 a	16,6±0,6 a	16,7±0,5 a	16,7±1,2 a	17,0±0,9 a
CHCM (%)	30,7±1,3 a	31,1±0,18 a	31,0±0,26 a	28,6±5,2 a	29,7±0,6 a	29,9±0,9 a	30,5±1,8 a	30,4±1,4 a
Leucócitos (10 ⁶ /mm ³)	4,30±0,98 b	4,12±0,44 b	4,37±0,66 b	4,60±1,20 b	1,96±0,36 a	1,97±0,29 a	2,13±0,15 a	1,76±0,15 a
Linfócitos (10 ⁶ /mm ³)	2,95±0,70 b	3,10±0,22 b	2,85±0,78 b	3,07±0,81 b	1,45±0,37 a	1,45±0,31 a	1,6±0,17 a	1,32±0,24 a
Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	848±73 a	931±60 a	878±74 a	880±70 a	877±96 a	886±67 a	895±52 a	800±39 a

Legenda - Hm: hemácia; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Teste do micronúcleo de eritrócitos de medula óssea

Na tabela 3 é mostrado o efeito da solução de polvilho de lobeira nas concentrações 450 mg/kg, 850 mg/kg e 1300 mg/kg e os danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida.

TABELA III

Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PEMNs) e relação de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) em medula óssea de ratas que ingeriram 450 mg/kg, 850 mg/kg e 1300 mg/kg da solução de polvilho de lobeira e as respectivas concentrações adicionadas de ciclofosfamida, durante 17 dias.

Tratamento	Nº de PCEs analisados	PEMNs (%)	PCE/NCE
Controle negativo	12000	0,16±0,03 a	1,29±0,04 a
Controle positivo	12000	2,02±0,14 b	1,05±0,06 b
Tratado 450 mg/kg	12000	0,14±0,06 a	1,18±0,04 a
Tratado 850 mg/kg	12000	0,17±0,03 a	1,22±0,05 a
Tratado 1300 mg/kg	12000	0,16±0,05 a	1,28±0,07 a
Ciclo + 450 mg/kg	12000	1,96±0,09 b	0,99±0,08 b
Ciclo + 850 mg/kg	12000	1,92±0,17 b	1,01±0,05 b
Ciclo + 1300 mg/kg	12000	2,16±0,10 b	0,96±0,06 b

Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Inibição da peroxidação lipídica *in vivo*

Pela análise da tabela 1, observa-se que não houve inibição significativa da peroxidação lipídica em cérebro de ratas quando administrada a solução de polvilho de lobeira por 18 dias.

O ácido ascórbico e os compostos fenólicos, antioxidantes existentes na fruta do lobo não foram capazes de inibir a peroxidação lipídica *in vivo*, assim como, também, não tiveram ação pró-oxidante.

Parâmetros hematológicos

Compostos como os polifenóis, existentes em vegetais, café e chá podem inibir a absorção de ferro (Disler et al., 1975; Gillooly et al., 1984) por formarem complexos (Zijp et al. 2000) e alterar os parâmetros hematológicos. Estes compostos quando em concentração acima de 1% são considerados nocivos à saúde (Corrêa et al., 2000), funcionando como fator antinutricional (Santos et al., 1997). A fruta-de-lobo, de acordo com Rocha (2006), apresentou um teor médio de 904,25 mg de ácido tânico/100g de amostra.

Dessa forma, considera-se que a concentração destes compostos contidos na fruta-de-lobo, na forma de polvilho de lobeira, não foi suficiente para promover alterações nos parâmetros hematológicos.

São encontrados nos frutos verdes da lobeira compostos polifenólicos nas formas monoméricas e dimeras (baixo peso molecular) e, nos frutos maduros, as formas poliméricas (alto peso molecular) (Chitarra & Chitarra, 2005).

Teste do micronúcleo de eritrócitos de medula óssea

Pela tabela 3, observa-se redução significativa da frequência de PCEMNs (eritrócitos policromáticos mononucleados) em amostras de células da medula óssea das ratas que receberam ciclofosfamida, após a ingestão da solução de polvilho por 17 dias.

Quanto à toxicidade, determinada pela relação PCE/NCE, não foi observada diferença significativa entre os resultados dos animais que ingeriram solução do polvilho de lobeira e o controle negativo (água). Contudo, houve diferença significativa entre o controle positivo e os grupos que receberam a ciclofosfamida ($p < 0,01$), comprovando que a concentração de ciclofosfamida administrada foi suficiente para exercer ação tóxica para a célula da medula óssea. A ingestão da solução do polvilho de lobeira, antes da administração da ciclofosfamida, não preveniu a citotoxicidade do agente mutagênico.

Os chamados agentes mutagênicos, os quais alteram a seqüência de bases no DNA, aceleram o aparecimento de mutações e, por uma questão de estatística, este aumento está associado ao desenvolvimento dos tumores (Camargo, 2002). Neste estudo, usando o teste do micronúcleo, as soluções do polvilho de lobeira não apresentaram efeito genotóxico ou citotóxico, assim como, também, não protegeram as células contra o efeito mutagênico da ciclofosfamida, mesmo quando esta solução foi ingerida por 18 dias consecutivos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem concluir que:

- A solução do polvilho de lobeira, quando comparados ao antioxidante padrão, BHT, não apresentou capacidade sequestrante de radicais livres;
- A ciclofosfamida mostrou-se eficaz na indução da citotoxicidade nos animais;
- A solução do polvilho de lobeira não apresentou efeito protetor contra a citotoxicidade e mutagenicidade induzidas pela ciclofosfamida. Assim como, também, não alterou os parâmetros hematológicos.

AGRADECIMENTOS

Ao PET (Programa de Educação Tutorial) pelo apoio financeiro, à tutora do PET e co-orientadora deste trabalho Profa Denise Aparecida Corrêa Moreira. À orientação da Profa Dra Stella Maris da Silveira Duarte, ao Laboratório de Bioquímica Básica e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

O presente trabalho foi aprovado pela Comitê de Ética e Biossegurança da UNIFAL-MG e os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas deste comitê.

Referências

1. BLOCH, A.; THOMSON, C. A. Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. *J Am Diet Assoc*, v. 95, p.493-496, 1995.

2. BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTH, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, v. 27(4), p. 902-908, out./dez. 2007.

3. BROWN, R. K.; KELLY, F. J.; Peroxides and other products. In: PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. (ed). *Free Radicals, a practical approach*. New York, IRL Press, 1996, p.119-131.

4. CAMARGO, A. C. O que é câncer? [S.1.]: CTHC, 2002. Disponível em: <http://hcancer.org.br/crom.1.html>. Acesso em 23 jun. 2002.

5. CHANG, C. V.; FELÍCIO, A. C.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, n. 2, p.265-269, 2002.

6. CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Qualidade pós-colheita dos frutos e hortaliças. In: FÓs colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990, p. 235-288.

7. CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; RIBEIRO, L. J. Determinação de alguns constituintes químicos de interesse nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill). *Ciência e Agrotécnologia*. Lavras, v. 24, n. 1, p.130-135, jan./mar. 2000.

8. CRUZ, G.L. *Dicionário de plantas úteis no Brasil*, 3. ed. Civilização Brasileira, Rio de Janeiro, 1985, p.360.

9. DALL'AGNOL, R.; LINO VON POSER, G. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p 337-341, 2000.

10. DISLER, P. B.; LYNCH, S. R.; CHARLTON, R. W.; TORRANCE, J. D.; BOTHWELL, T. H. The mechanism of the inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1282, p. 63-70, 1996.

11. DUARTE, S. M. S. Atividade antioxidante e antimutagênica in vitro e in vivo da bebida de café. 2004. p. 118. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, UFPA, Belém.

12. DUTHIE, G. G.; BROWN, K. M. Reducing the Risk of Cardiovascular Disease, ch 2, p.19-38, In: *Functional Foods*, ed. Goldberg, I. Chapman and Hall, New York, 1994.

13. FERREIRA, B. R. C.; NUNES, F. R. A.; NUNES, M. L. A.; PAULA, F. B. A.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; NUNES, M. L. A.; SILVA, T. D.; MOREIRA, D. A. C. Parâmetros bioquímicos de animais tratados com polvilho extraído dos frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. In: *XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. Anais p. 164, 2005.

14. GILLLOLY, M.; BOTHWELL, J. D.; TORRANCE, A. P.; DERMAN, D. P.; CHARLTON, R. W.; MILLS, W.; BEZWODA, W. R. The effects of organic acids, phytates and polyphenols on absorption of iron from vegetables. *British Journal of Nutrition*, v. 49, p.331-342, 1984.

15. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. London: Oxford: University Press, 936p. 1999.

16. JACOB, R. A.; The Integrated Antioxidant System. *Nutr Res*, v. 15, n. 5, p.755-766, 1995.

17. JONES, L. H.; ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic acid on cróton oil and arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Inflammation Research*, v. 44, p.372-375, 1995.

18. KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food. Chem.* v. 47, p. 4638-4644, 1999.

19. KNASMÜLLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B. J.; NOBIS, E. C.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p.1051-1062, 2002.

20. MANCINI-FILHO, J. Importância química e nutricional dos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos. In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M (eds). *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP: Campinas. v. II, p.174-176, 2001.

21. MARUO, V. M.; SOARES, M. R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H. S. Embryotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. *Neurotoxicol Teratol.*, v. 25, p.627-631, 2003.

22. OLIVEIRA JÚNIOR, E. N.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, J. Z. L. Análise nutricional da fruta de lobo (*Solanum lycocarpum* St.Hill) durante o amadurecimento. *Ciênc. agrotec. Lavras*. v. 27, n. 4, p. 848-851, jul./ago., 2003.
23. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, K. M. Mutagênese ambiental. Canoas, Editora Ulbra, 2003, 355 p.
24. ROCHA, D.A. Caracterização físico-química e química do polvilho da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill). 2006. p. 51. Tese de mestrado – Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, UFLA. Lavras.
25. SANTOS, S. A.; ABREU, L. R.; CHAGAS, S. J. R. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 3, n. 3, p.107-109, set./dez. 1997.
26. SCHWARZ, A.; SOARES, M. R.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in útero and during lactation: Neurochemical behavioral and histopathological effects. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 27, p.861-870, 2005.
27. STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 32, p.79-90, 1994.
28. WEISBURGER, J. H. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.*, v. 37, n. 9-10, p.943-948, 1999.
29. WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. Screening for Phase II Enzyme inducing and Antioxidant Activities of Common Vegetables. *J. Food Science*, v. 67, n. 7, p.2583-2588, 2002.
30. WINTERBOURN, C. C.; GUTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Doxorubicindependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *Free Radicals Biology & Medicine*, v.2, p.1119-1122, 1981.
31. ZIJP, I. M.; KORVER, O.; TIJBURG, L. B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, v. 40, p.371-398, 2000.
32. WEISBURGER, J. H.; Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.*, v. 37, n. 9-10, p.943-948, 1999.
33. WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. Screening for Phase II Enzyme inducing and Antioxidant Activities of Common Vegetables. *J. Food Science*, v. 67, n. 7, p. 2583-2588, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Thiago Belchior de Oliveira
Rua Condelaç Chaves de Andrade, 265
CEP. 12460-000 - Campos do Jordão - SP



Excelência de Conhecimento em Diagnóstico Laboratorial



Centro de Pós-Graduação

CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU:

ANÁLISES CLÍNICAS
HEMATOLOGIA CLÍNICA
MICROBIOLOGIA CLÍNICA
CITOLOGIA CLÍNICA
GESTÃO EM LABORATÓRIO CLÍNICO



CURSOS DE TREINAMENTO PROFISSIONAL:

MICROBIOLOGIA
HEMATOLOGIA
IMUNOLOGIA

INFORMAÇÕES E INSCRIÇÕES:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Rua Vicente Licínio,99 Tijuca
Rio de Janeiro - RJ CEP: 20.270-902

Fone: 21 2187 - 0800
Fax: 21 2187 - 0805

Site: www.sbac.org.br
E-mail: cpg@sbac.org.br

Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) em espécimes clínicos de origem hospitalar*

Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) of human clinical samples origin hospital

Andréa Silva de Souza¹; Jane Bonissato Torres¹ & Rodrigo Coelho de Oliveira²

RESUMO - A produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) é um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Sua pesquisa deve ser realizada para evitar que resultados falsos sensíveis para as cefalosporinas de terceira geração e aztreonam sejam reportados nos testes de sensibilidade. Além disso, informações sobre a ocorrência de ESBLs, contribuem para que medidas preventivas sejam tomadas, a fim de diminuir a disseminação desse mecanismo de resistência entre as bactérias. O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de cepas produtoras de ESBLs em amostras clínicas de pacientes internados em quatro hospitais da cidade de Ubá-MG. Trata-se de uma pesquisa descritiva-exploratória que consiste na análise de 54 bastonetes Gram negativos (BGN), os quais, foram identificados e submetidos à pesquisa de ESBLs das classes A, D e AmpC pelo método da aproximação do disco. Entre as amostras bacterianas analisadas, 44 (81%) foram positivas para a pesquisa de ESBLs, sendo 39% *Klebsiella* sp. e 23% *Escherichia coli*. Em outros BGN a ocorrência foi de 38%. Conforme os resultados, concluímos que a ocorrência de ESBLs nos hospitais da cidade de Ubá, MG, foi consideravelmente elevada. Tornando-se necessário, o monitoramento da resistência de bactérias patogênicas, através de métodos corretos de diagnóstico e terapêutica, auxiliando, portanto, na redução de disseminação em ambiente hospitalar.

PALAVRAS-CHAVE - β -Lactamases de Espectro Estendido. Resistência. Bactérias Gram-negativas. Infecção Hospitalar.

SUMMARY - The production of β -lactamase extended-spectrum (ESBLs) is an important mechanism of resistance to β -lactam antibiotics in gram-negative bacteria. His research must be done to prevent false sensitive to the third-generation cephalosporin and aztreonam are reported in the tests of sensitivity. In addition, information about the occurrence of ESBLs, which contribute to preventive measures are taken to reduce the spread of this mechanism of resistance among bacteria. The purpose of this study was to determine the occurrence of strains producing ESBLs in clinical specimens from patients in four hospitals in the city of Ubá-MG. This is a descriptive and exploratory research that is the analysis of 54 Gram negative rods (GNB), which have been identified and submitted to the research of ESBLs of class A, D and enzymes by the method of approximation of the disc. Among the bacteria samples analyzed, 44 (81%) were positive for the detection of ESBLs, 39% *Klebsiella* sp. and 23% *Escherichia coli*. On the other GNB occurrence was 38%. As the results, we concluded that the occurrence of ESBLs in hospitals of the city of Ubá, MG, was considerably high. Become necessary, monitoring the resistance of pathogenic bacteria, through correct methods of diagnosis and therapy, helping thus to reduce the spread in the hospital.

KEYWORDS - Extended Spectrum β -Lactamases. Resistance. Gram Negative Bacteria. Hospital Infection.

INTRODUÇÃO

Um dos principais mecanismos de resistência bacteriana é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) por bactérias Gram-negativas, que refere-se às β -lactamases que apresentam resistência à maioria dos β -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas de espectro ampliado e monobactam, como o aztreonam. Membros das famílias *Enterobacteriaceae* (como as bactérias do gênero *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Providência* e *Morganella*) e *Pseudomonaceae* comumente expressam β -lactamases codificadas por genes localizados em plasmídeos ou cromossomos, capazes de se replicar e disseminar entre bactérias de diferentes espécies, assim como entre gêneros distintos (MACEDO *et al.*, 2005; JUNIOR *et al.*, 2004). É por esse motivo que as β -lactamases representam o principal mecanismo de resistência a β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas (CARNEIRO *et al.*, 2008; PICÃO *et al.*, 2007).

Em 1983 foram detectados na Alemanha (Frankfurt) os primeiros isolados clínicos de *Escherichia coli* (*E. coli*) e

Klebsiella pneumoniae produtoras de ESBLs, resistentes às cefalosporinas (exceto as cefamicinas) e aos monobactâmicos, não hidrolizando, entretanto, os carbapenêmicos, como o imipenem e meropenem (DALMARCO *et al.*, 2006). Em 1985, o primeiro surto hospitalar causado por bactérias produtoras de ESBLs ocorreu na França e depois nos EUA, no fim da década de 1980 e início de 1990. A partir destes primeiros achados estritamente hospitalares, o isolamento deste fenômeno vem se tornando cada vez mais comum, além disso, este fenômeno já foi encontrado em diversos gêneros de Enterobactérias e também em bacilos Gram-negativos da família *Pseudomonaceae*, como o *Pseudomonas aeruginosa* (NOGUEIRA, 2005; SILVA, 2006). Os membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae* são importantes patógenos humanos o que os tornam potenciais agentes de infecções hospitalares, sendo seu estudo importante nesse ambiente. As bactérias Gram-negativas são freqüentemente relacionadas a infecções urinárias, septicemia, pneumonias associadas a ventilação mecânica, pneumonias nosocomiais em pacientes pediátricos, meningite, septicemia neonatal, infecções de feridas em pé diabético (NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Recebido em 03/02/2009

Aprovado em 28/07/2010

*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, Ubá.

¹Farmacêuticas-Bioquímicas, Pós-graduandas do Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Análises Clínicas, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora – Minas Gerais, Brasil.

²Farmacêutico-Bioquímico. Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa e docente da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, campus II, Ubá – Minas Gerais, Brasil.

A classificação molecular das ESBLs é baseada na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas. Nos dias atuais, 04 classes são conhecidas (A, B, C e D), e são correlacionadas com suas classificações funcionais, segundo Ambler (AMBLER *et al.*, 1991). As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas serinas, possuindo uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo (DALMARCO *et al.*, 2006). A classe A, de Ambler são penicilinasas e cefalosporinasas, já as oxa-derivadas são ESBLs pertencentes a classe D (oxacilinasas), ambas usualmente encontradas em plasmídeos e transposons. As enzimas do tipo AmpC são cromossomais e têm sua expressão induzível, sendo produzidas em quantidades insignificantes na ausência de β -Lactâmicos e em grandes quantidades quando eles estão presentes. A classe B ou metalo- β -Lactamases também são plasmidiais e necessitam de zinco para sua ação e são capazes de hidrolisar β -Lactâmicos de todas as classes químicas, exceto os monobactâmicos, e não são inibidas por inibidores de β -Lactamases como o clavulonato ou o tazobactam (AMBLER, 1980).

A ampla e rápida distribuição geográfica das ESBLs é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro estão se deparando, já que a transmissão no ambiente hospitalar é muito complexa e existem vários fatores de risco independentes entre si, associados à produção de ESBLs, tais como: o tempo de permanência do paciente nos hospitais; casos de hospitalização anterior, onde houve o uso de diversos antimicrobianos para erradicação da infecção, principalmente cefalosporinas de amplo-espectro; utilização de procedimentos invasivos, como cateteres urinários e arteriais, além de intubações pulmonares e mecanismos de ventilação pulmonar artificial (BLATT, 2003; GARNER, 1996).

Devido ao fato da pesquisa de ESBLs não ser realizada em hospitais de Ubá e de sua detecção não ser visualizada no antibiograma padrão, há um aumento na prescrição e no uso indevido de antibióticos, o que favorece a disseminação de resistência bacteriana e aumenta o sofrimento do paciente (GARNER, 1996).

Assim, o conhecimento da ocorrência de ESBLs entre amostras hospitalares torna-se fundamental para que o clínico possa instituir a terapia antimicrobiana adequada, diminuindo os índices de mortalidade por infecções hospitalares causados por estes patógenos, contribuindo para uma melhora do quadro clínico do paciente.

Os objetivos deste trabalho foram detectar cepas produtoras de ESBLs das classes A, D e AmpC em amostras clínicas de ambiente hospitalar, demonstrando a prevalência destas enzimas nos diferentes gêneros bacterianos e descrever a importância da realização de métodos laboratoriais para a detecção de ESBLs.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho trata-se de um estudo descritivo-exploratório e foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Campus II, Ubá.

Neste estudo foram analisadas bactérias Gram-negativas. Dentre as quais, 54 bastonetes Gram-negativos foram isolados de diferentes fluidos biológicos, provenientes de pacientes internados em distintos setores de 4 (quatro) hospitais da cidade de Ubá, de ambos os sexos, distintas faixas etárias e raças, no período de fevereiro de 2008 a outubro de 2008.

As amostras foram cultivadas em ágar Nutriente e incubadas

as a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. As colônias bacterianas isoladas foram submetidas ao teste de Gram e as classificadas como bastonetes Gram-negativos foram repicadas para o meio seletivo ágar Mac-Conkey e incubadas a 37°C por 24 horas.

A partir de colônias puras isoladas do ágar Mac-Conkey foi realizado a pesquisa de ESBLs e a classificação em gênero das amostras. Para a pesquisa de ESBLs, as colônias bacterianas foram diluídas em solução salina 0,85% até se obter uma turvação correspondente a 0,5 na escala de MacFarland correspondente a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL e espalhadas na superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton com um swab estéril em três direções diferentes.

Para caracterizar as bactérias produtoras de β -lactamases das classes A e D foi utilizada a metodologia do Duplo-disco sinergismo que utiliza antibióticos marcadores da possível presença da enzima pelo método da aproximação do disco, de acordo com o manual Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2005, antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Utilizou-se uma placa de petri contendo ágar Muller-Hinton, previamente inoculada com o isolado a ser estudado, e ajustado para 0,5 na escala de MacFarland. Colocou-se no centro do ágar um disco de amoxicilina/ácido clavulânico 20/10 μg e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores cefotaxima, 30 μg ; aztreonam, 30 μg ; ceftazidima, 30 μg e ceftriaxone, 30 μg , na distância de 20 a 30 milímetros de centro a centro, em relação ao disco central. Após incubação por 19 horas \pm 1 hora a $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, foi feita a interpretação do teste. A formação de uma zona fantasma entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico, é positiva para a presença de β -lactamases das classes A e D.

Para identificação de ESBLs da classe C colocou-se, na placa já inoculada com a amostra, um disco de cefoxitina 30 μg próximo a um disco de Aztreonam 30 μg (15 mm de centro a centro). Após incubação por 19 horas \pm 1 hora a $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, foi feita a interpretação do teste e o aparecimento de uma zona truncada entre os dois discos é indicativo da presença de ESBLs da classe C.

Para identificação em gênero, as amostras foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: motilidade, descarboxilação da L-lisina, produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), hidrólise da uréia, fermentação da glicose e sacarose, produção de gás carbônico (CO_2), triptofano desaminase e produção de indol, segundo o meio de cultura Instituto Adolfo Lutz (IAL). Além da prova do citrato, atividade de oxidase e lactase. A partir dos resultados obtidos desses testes bioquímicos, cada amostra foi classificada segundo classificação taxonômica descrito no manual de Bergey.

O estudo teve uma limitação quanto à aquisição do disco de EDTA 750 μg , sendo assim, não foi possível a realização da pesquisa de ESBLs da classe B.

Os dados foram analisados através de estatísticas descritivas com o uso de porcentagens.

RESULTADOS

De acordo com a interpretação dos testes bioquímicos realizados, as 54 amostras bacterianas foram classificadas em 8 (oito) gêneros distintos, conforme a figura 1. Observa-se que houve um predomínio de bactérias do gênero *Klebsiella* sp. (35%) e *Escherichia coli* (22%), além de uma importante variedade de outros gêneros bacterianos.

A partir da identificação das amostras, foi realizado os testes para pesquisa de ESBLs das classes A, D e Amp C.

DISCUSSÃO

Foram encontradas cepas produtoras de ESBLs em todos os hospitais de Ubá pesquisados. Os gêneros bacterianos foram classificados como ESBLs (+) ou ESBLs (-). Foram considerados ESBL (+) aqueles que produziram enzimas das classes A, D, Amp C, ou ainda, ambas as classes; e ESBLs (-) aqueles que não produziram nenhuma das classes enzimáticas (Tabela 1). Nota-se que houve uma prevalência de atividade de ESBLs na maioria das amostras analisadas (81%). Considerando apenas as amostras ESBL (+), observa-se que *Klebsiella* sp. e *Escherichia coli* corresponderam a 62% de todas as amostras ESBL (+), enquanto que os outros 6 (seis) gêneros corresponderam a apenas 38% (Tabela 2). De acordo com os percentuais de produção das diferentes classes de ESBLs por todos os BGN identificados, observou-se que 17% das amostras produziram apenas ESBLs das classes A e D; 7% apenas da classe AmpC e 57% produziram ambas as classes, como demonstrado na figura 2.

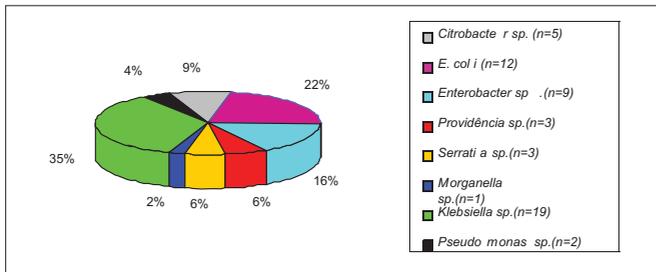


Figura 1: Prevalência de microrganismos detectados por testes bioquímicos.

TABELA I
Relação de BGN de distintos gêneros quanto à presença ou não de atividade ESBL.

Gênero	Nº de isolados	ESBL (+)	ESBL (-)
<i>Citrobacter</i> sp.	5	2	3
<i>Klebsiella</i> sp.	19	17	2
<i>Enterobacter</i> sp.	9	7	2
<i>Providencia</i> sp.	3	3	-
<i>Serratia</i> sp.	3	3	-
<i>Escherichia coli</i>	12	10	2
<i>Morganella</i> sp.	1	1	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	1	1
Total	54	44 (81%)	10 (19%)

TABELA II
Distribuição de ESBL (+) segundo gêneros bacterianos.

Gênero	Nº de isolados ESBL (+)	% de ESBL (+)
<i>Citrobacter</i> sp.	2	4%
<i>Klebsiella</i> sp.	17	39%
<i>Enterobacter</i> sp.	7	16%
<i>Providencia</i> sp.	3	7%
<i>Serratia</i> sp.	3	7%
<i>Escherichia coli</i>	10	23%
<i>Morganella</i> sp.	1	2%
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2%
Total	44	100%

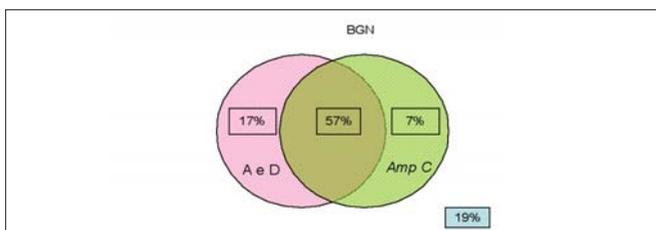


Figura 2: Percentual de bactérias produtoras de ESBLs das classes A, D e Amp C. A taxa de 19% corresponde às amostras que não produziram nenhuma das classes enzimáticas

De acordo com os resultados da figura 1, observamos que, das bactérias gram-negativas isoladas, houve uma maior prevalência dos gêneros *Klebsiella* sp. (35%) e *Escherichia coli* (22%) sobre os demais gêneros identificados (43%). Bacilos Gram negativos estão entre as principais cepas bacterianas causadoras de infecções hospitalares, sendo seu estudo importante nesse ambiente (JUNIOR *et al.*, 2003; AUGUSTI *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2003). Nogueira, 2005 analisou quatrocentos e noventa e oito (498) amostras de diferentes fluidos biológicos, provenientes de dois hospitais de Curitiba, no período de agosto de 2003 a agosto de 2004. A identificação foi realizada através de métodos bioquímicos onde foram encontrados os seguintes gêneros bacterianos: *E. coli* (37%), *Klebsiella* sp. (26%), *Enterobacter* sp. (17%), *Proteus* sp. (7%), *Serratia* sp. (5%), *Morganella* sp. (4%), *Citrobacter* sp. (3%) e *Providência* sp. (1%).

A literatura descreve que *Klebsiella* sp e *Escherichia coli* são os principais reservatórios hospitalares dos genes responsáveis pela codificação de ESBLs. Entretanto, nos últimos anos, tem-se observado sua produção também por amostras de *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp, *Serratia* sp, *Morganella* sp. e *Pseudomonas* sp isoladas de ambiente hospitalar (MUNOZ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2000).

Os resultados representados na tabela 2, demonstram que os gêneros bacterianos de maior percentual de produção de ESBLs correspondem às bactérias mais identificadas. Provavelmente esses isolados estão disseminados em todos os setores dos hospitais pesquisados, uma vez que as amostras foram obtidas de vários setores e que o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro está atuando de modo a selecionar estirpes resistentes.

Silva e Salvino, 2000 isolaram em Vitória-ES 53 bactérias produtoras de ESBLs pelo método de difusão em disco, distribuindo-se da seguinte forma: *Klebsiella* sp 37 (69,7%), *E. coli* 9 (17%), *Enterobacter* sp 5 (9,4%) e *Serratia* sp. 2 (3,8%). É importante salientar a presença de *Pseudomonas* sp. produtora de ESBLs, uma vez que a existência dessa bactéria representa um grande desafio na prática clínica. Amostras de *Pseudomonas* sp. apresentam resistência inata a várias classes de drogas e, freqüentemente, são agentes etiológicos de diversas infecções graves relacionadas a altas taxas de mortalidade (PICÃO *et al.*, 2007; CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

Os dados epidemiológicos brasileiros sobre a presença de ESBLs entre amostras clínicas de *Pseudomonas* sp. ainda são escassos (CASTANHEIRA *et al.*, 2004). Picão *et al.*, 2007 realizou um estudo no Laboratório Especializado em Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo que revelou que 15,2% de *Pseudomonas* sp. isoladas de 48 pacientes internados no Hospital São Paulo eram produtoras de ESBLs, detectadas pelo método de difusão em disco.

Segundo Blatt, 2000 a prevalência de cepas produtoras de ESBLs em alguns hospitais brasileiros, é em torno de 39%, semelhante aos descritos por outras pesquisas internacionais. Nos hospitais de Ubá está bem acima do que apresenta em alguns hospitais brasileiros, está com 81% (tabela 1). Menezes *et al.*, 2008 analisaram 225 amostras no Hospital Geral de Fortaleza, pelo método de dupla difusão em disco, no período de junho a dezembro de 2003, e encontraram um índice de 81,25% de positividade para ESBLs.

Na verdade, a tendência de achados bacterianos clínicos produtores de ESBLs tende só a aumentar, devido ao aumento da pesquisa dessas cepas bacterianas resistentes e ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro em ambiente hospitalar que, por pressão seletiva, seleciona

essas bactérias. Tal fato é comprovado nos hospitais da cidade de Ubá onde esses isolados resistentes foram encontrados em todos os hospitais pesquisados. E, pelo fato, de 64% desses isolados apresentarem atividade de ESBLs da classe AmpC, que é um mecanismo de resistência atuante apenas quando induzida por antibióticos (SILVA, 2006). Bertoncheli et al, 2005, realizou um estudo no hospital universitário de Santa Catarina, no período de 16/05/06 a 16/06/06, onde isolou 45 cepas produtoras de ESBLs, sendo 35 (67,30%) A e D e 10 (32,7%) AmpC. De acordo com a figura 2, também houve um predomínio de resistência pela produção das enzimas A e D (74%). Isso se explica pelo fato das enzimas das classes A e D estarem presentes tanto em cromossomos, quanto em plasmídeos, o que favorece a transmissão entre bactérias e sua disseminação dentro de hospitais (SILVA, 2006). Destaca-se, também, que 57% dos isolados apresentaram dois mecanismos de resistência, simultaneamente, tornando-os mais eficazes contra os antibióticos utilizados no tratamento hospitalar (NOGUEIRA, 2005).

CONCLUSÃO

Conforme os resultados apresentados, concluímos que a ocorrência de ESBLs nos hospitais da cidade de Ubá, MG, foi consideravelmente elevada, prevalecendo o gênero *Klebsiella* sp. como potencial produtor. Esta alta positividade para ESBLs é devido, em grande parte, à pressão seletiva sofrida pela utilização indiscriminada e errônea de cefalosporinas de 2ª e 3ª gerações, uma vez que, estas bactérias revelam uma falsa sensibilidade ao antibiótico pela técnica convencional. Porém, pela técnica de aproximação do disco demonstram ser resistentes, o que dificulta o diagnóstico laboratorial. Logo, como tratamento de escolha, são utilizados os antibióticos da classe dos carbapenêmicos. Para evitar isto, será necessário mudar os comportamentos atuais como o diagnóstico e a terapêutica. A prioridade principal deveria ser o incentivo financeiro aos laboratórios clínicos, por parte do governo, com objetivo de atualizar sua equipe técnica e equipamentos necessários para se detectar estas enzimas, além de outros mecanismos de resistência emergentes. Dessa forma, o monitoramento da resistência das bactérias patogênicas podem auxiliar aos clínicos, farmacêuticos e demais profissionais da saúde no acompanhamento terapêutico e prevenção da disseminação em ambiente hospitalar.

RECOMENDAÇÕES

Os resultados alertam para a necessidade de implantação de um sistema de controle de bactérias produtoras de ESBLs nos hospitais de Ubá, através de medidas preventivas que reduzam a disseminação de microrganismos resistentes, como a investigação prévia de pacientes recentemente internados (análise de swab retal, por exemplo), seguido, do isolamento de pacientes infectados.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos bioquímicos dos hospitais, que cederam, gentilmente, as amostras clínicas que foram analisadas.

REFERÊNCIAS

1. Ambler RP - The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980 May; 289 (1036):321-31.
2. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M,

Levesque RC, Tiraby G, Waley SG - A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. Biochem. 1991 May;15 (1):269-70.

3. Augusti GR, Superti S, Zavascki AP - Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Scientia Médica. 2007 Out/Dez; 17(4):192-6.
4. Bergey DH, Robert SB, Breed EGD, Parker H - Bergeys Manual of determinative bacteriology. 1934.
5. Bertoncheli CM, Hörner R, Dal F, Salla NFL, Righi RA - Bacilos Gram negativos produtores de β -Lactamases isolados em hospital universitário. Infarma. 2005 Set/Out; 15(10):81-3.
6. Blatt JM - Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. Newslab. 2000; 40:86-96.
7. Blatt JM - Mecanismo de resistência e identificação das betalactamases de espectro ampliado. Newslab, São Paulo. 2003; 40 (4):86-97.
8. Carneiro LC, Carvalhães TT, Pesquero MA, Quintana RC, Feito SB, Filho JE, Oliveira MAC - Identificação de bactérias causadoras de infecção hospitalar e avaliação da tolerância a antibióticos. NewsLab. 2008; (86): 106-108.
9. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN - Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(6):2344-5.
10. Clinical Laboratories Standards Institute - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI. Wayne. PA. 2005.
11. Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM - Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). RBAC. 2006; 38(3):171-177.
12. Garner JS - Evolution of isolation practices, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Rev Infect Control. 1996 Feb; 24(1):24-31.
13. Junior CT, Hovnanian ALD, Franca SA, Carvalho CRR - Prevalence rates of infection in Intensive Care Units of a tertiary teaching Hospital. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 2003; 58(5):254-259.
14. Junior MAS, Ferreira ES, Conceição GC - Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. NewsLab. 2004; (63):152-174
15. Macedo MLAP, Cartaxo RS, Almeida TCC, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HDM - Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. UNIPOR Cient. Ciênc. Biol. Saúde, Londrina. 2005 out; 7(1):59-63.
16. Menezes EA, Alencar AM, Cunha FA, Ângelo MRF, Salviano MNC, Oliveira IRN - Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hospital de fortaleza. RBAC. 2008; 40(1):7-11.
17. Munoz GA, Price LS - The new beta-lactamases. N Engl J Med. 2006 Jan; 352(4):380-91.
18. Nogueira KS - Ocorrência de Beta-lactamases de espectro ampliado em Enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários [tese]. (Acesso em 18/07/09), Curitiba. 2005;8-73.
19. Oliveira AC, Silva RS - Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana. Rev Eletrônica de Enfermagem (Internet). 2008; 10(1):189-197.
20. Pereira AS, Filho JRC, Tognim MCB, Sader HS - Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. Jornal Bras. Pat. e Med. Laboratorial, Rio de Janeiro. 2003; 39(4):301-2.
21. Picão RC, Gales AC - β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só imaginação?. Prática Hospitalar. 2007 Jan/Fev; 9 (49): 79-82.
22. Silva CHPM, Salvino CR - Importância do Reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e suas Implicações Terapêuticas. Newslab. 2000; (41):104-112.
23. Silva EAMS - Detecção de Beta-lactamases de Espectro estendido em isolados clínicos bacterianos [tese]. (Acesso em 26/09/08), Recife. 2006;18-36.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Andréa Silva de Souza
Rua Mauri Martins de Oliveira, nº 291
Santa Bernadete – Ubá, Minas Gerais.
andreassfarmacia@yahoo.com.br

Infecções do Trato Urinário Diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS*

Urinary Tract Infections Diagnosed at the Laboratory of the University URI - Campus of Erechim/RS

Viviane Tortelli Menin¹ & Neiva Aparecida Grazziotin²

RESUMO - As Infecções do Trato Urinário (ITU) são definidas como a presença de microrganismos patogênicos no trato urinário, podendo se localizar desde a uretra até os rins. Dentre as doenças infecciosas, as ITU estão entre as mais comuns na prática clínica e acometem homens e mulheres em qualquer idade. O presente trabalho objetivou avaliar a ocorrência de ITU diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS. Durante o período de outubro de 2006 a outubro de 2007 foram analisados os resultados de 195 uroculturas, onde foram identificados 36 casos de ITU. A identificação das bactérias foi realizada por métodos bioquímicos tradicionais e o antibiograma pelo método de disco-difusão. Pacientes do sexo feminino foram os mais acometidos (97,22%). Observou-se um predomínio de ITU em indivíduos com idade superior a 40 anos, totalizando 47,22% dos casos. A *Escherichia coli* foi o microrganismo mais freqüente (80,55%). Os uropatógenos apresentaram maiores índices de susceptibilidade à Ofloxacina (94,11%) e maiores índices de resistência à Ampicilina (69,44%). O diagnóstico correto das ITU é extremamente importante, pois permite a aplicação de um tratamento adequado e o uso prudente e racional dos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE - Infecções do Trato Urinário, *Escherichia coli*, urocultura.

SUMMARY - The Urinary Tract Infections (UTI) are defined as the presence of pathogenic microorganisms in the urinary tract and can be located from the urethra to the kidneys. Among infectious diseases, the UTI are among the most common clinical practice and affect men and women of all ages. This study aimed to evaluate the occurrence of UTI diagnosed at the Laboratory of the University URI - Campus of Erechim/RS. During the period of October 2006 to October 2007 were analysed results of 195 urine culture, which were identified 36 cases of UTI. The identification of the bacteria was performed by traditional biochemical methods and by disk-diffusion method of dissemination. Patients females were the most affected (97.22%). There was a predominance of UTI in individuals aged over 40 years, totaling 47.22% of cases. The *Escherichia coli* was the most common microorganism (80.55%). The uropathogenes presented highest rates of susceptibility to Ofloxacin (94.11%) and highest rates of resistance to Ampicillin (69.44%). The correct diagnosis of UTI is extremely important because it allows the application of appropriate treatment and prudent and rational use of antimicrobials.

KEYWORDS - Urinary Tract Infections, *Escherichia coli*, urine culture.

INTRODUÇÃO

As Infecções do Trato Urinário (ITU) são definidas como a presença de microrganismos patogênicos no trato urinário, podendo se localizar desde a uretra até os rins. Estas infecções podem ser divididas em quatro grupos: uretrites, síndrome uretral aguda, cistites e pielonefrites. Além disso, as ITU são subdivididas em sintomáticas, assintomáticas, agudas, recorrentes, crônicas, complicadas e descomplicadas.⁸

Dentre as doenças infecciosas, as ITU estão entre as mais comuns na prática clínica. Acometem homens e mulheres em qualquer idade, predominando em adultos do sexo feminino.¹⁵ As ITU são mais freqüentes em mulheres do que em homens devido as suas características anatômicas: uretra mais curta e a maior proximidade com a região perianal.²⁰ Outros fatores que aumentam o risco de ITU em mulheres estão: o ato sexual, a higiene deficiente, a menopausa e a gestação. Nesta, ocorre redução da capacidade urinária e pressão sobre os ureteres pela expansão do útero na gravidez.¹² Nesta fase, a urina torna-se rica em vitaminas, glicose e aminoácidos, facilitando o crescimento das bactérias.⁴ Com relação às ITU em homens, pode-se observar que tais infecções estão relacionadas principalmente a problemas prostáticos.¹⁹ Em neonatos e lactentes, as infecções são

mais comuns no sexo masculino e estão relacionadas a anomalias congênitas. Durante a infância há predomínio no sexo feminino, que permanece na idade adulta.⁹ No diabetes mellitus, há uma grande concentração de glicose na bexiga, predispondo a introdução e multiplicação de bactérias no trato urinário.¹³ Obstrução urinária como cálculos, corpos estranhos como sondas e catéteres, imunossupressão e refluxo vesico-uretral também são fatores predisponentes de infecção urinária.⁴

Algumas infecções podem ser totalmente assintomáticas e silenciosas, entretanto, a maioria delas causa sintomas como urgência miccional e dolorosa; ato de urinar várias vezes ao dia e em pequenas quantidades de urina com mau cheiro e turva; dor suprapúbica e, em caso de comprometimento renal, a febre pode estar associada.^{9,16}

Entre os diversos agentes etiológicos responsáveis pelas ITU destacam-se os bacilos Gram-negativos, que muitas vezes estão presentes na flora normal do organismo. Os principais uropatógenos causadores de infecções urinárias são: *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos como a *Candida sp.*, sendo a *E. coli* o microrganismo mais freqüentemente isolado.¹⁰

O diagnóstico clínico de uma ITU é dado de acordo com a sintomatologia do paciente, enquanto que o diagnóstico

Recebido em 20/02/2009

Aprovado em 10/06/2010

*Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim/RS, Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia Bioquímica Clínica.

¹Acadêmica do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim/RS.

²Farmacêutica Bioquímica, Professora Mestre do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim/RS.

laboratorial é dado de acordo com diferentes parâmetros. O exame de urina irá fornecer ao quadro clínico, os dados que praticamente confirmam o diagnóstico de ITU: presença de piúria, hematúria e bacteriúria, sendo que os valores encontrados são proporcionais à intensidade da infecção.¹⁴ A urocultura é o exame de escolha para a confirmação da ITU. É considerada positiva quando o crescimento bacteriano for de pelo menos 100.000 unidades formadoras de colônias por mL de urina (100.000 UFC/mL).¹⁷

A seleção de um agente antimicrobiano depende de vários fatores: o local da infecção, uma variedade de fatores do hospedeiro, as características de absorção do agente antimicrobiano, assim como sua via de excreção, propriedades farmacocinéticas e a frequência de dosagem do agente antimicrobiano, suscetibilidade local do microrganismo ao agente antimicrobiano.¹⁰

O antibiograma é um teste que oferece, como resultado, padrões de resistência ou susceptibilidade de uma bactéria específica a vários antimicrobianos. No método da difusão de disco, os antimicrobianos são impregnados em um disco de papel de filtro e colocados sobre o meio de cultura inoculado com a bactéria. A escolha do antimicrobiano baseia-se na medida do halo de inibição do crescimento bacteriano formado ao redor do disco.¹¹

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de ITU diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS, no período de outubro de 2006 a outubro de 2007, relacionando-as com a idade e sexo dos pacientes acometidos, bem como a suscetibilidade frente aos antimicrobianos comumente empregados na prática clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os resultados de 195 uroculturas realizadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS, durante o período de outubro de 2006 a outubro de 2007.

As amostras constituíram, na sua maioria, de urina de jato médio. Os pacientes foram orientados para realizar uma higienização prévia na região genital, desprezando o primeiro jato de urina, coletando o jato médio e desprezando o restante da micção. Outras amostras que também foram processadas constituíram-se de urina de qualquer jato, obtidas de crianças com auxílio de saco coletor. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e levadas imediatamente ao laboratório. Destas amostras, foram feitas sementeiras semiquantitativas em placa de ágar Mac Conkey e Cled, utilizando uma alça calibrada de 0,01mL (10µL). As culturas foram incubadas durante 24-48 horas, a uma temperatura de 35°C. Foram consideradas positivas as urinas que apresentaram crescimento superior a 100.000 UFC/mL.

Após isolamento primário, as amostras foram submetidas à identificação através de provas bioquímicas. Além da identificação dos microrganismos, fez-se também o perfil de susceptibilidade frente aos agentes antimicrobianos (antibiograma), que foi realizado de acordo com o protocolo da técnica de difusão de Kirby-Bauer. Preparou-se um inóculo equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, semeou-se em placa de Ágar Mueller Hinton e colocou-se os discos de antibióticos selecionados. Após, as placas foram incubadas à 35°C durante 18 horas e, posteriormente foi feita a interpretação através da medida do halo de inibição do crescimento bacteriano, sendo classificado em sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R).

Os antimicrobianos usados foram: Ácido Nalidíxico, Amoxicilina-Ácido Clavulânico, Ampicilina, Gentamicina, Nitrofurantoina, Ofloxacina e Sulfametaxazol-Trimetropim. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim.

RESULTADOS

No período compreendido entre outubro de 2006 e outubro de 2007, foram avaliadas 195 uroculturas. Entre estas, verificou-se que 36 (18,46%) amostras obtiveram resultado positivo para ITU (Fig. 1).

A Fig. 2 mostra a distribuição das ITU em relação ao sexo dos pacientes. Pacientes do sexo feminino foram os mais acometidos, representando 35 (97,22%) dos casos. Pacientes do sexo masculino representaram 1 (2,77%) dos casos.

Em relação à idade dos pacientes com ITU, 8 (22,22%) possuíam idade inferior a 20 anos, 11 (30,55%) estavam na faixa etária de 20 a 40 anos e, 17 (47,22%) apresentavam idade superior a 40 anos (Fig. 3).

Entre as uroculturas com contagem superior a 100.000 UFC/mL, foram isolados os seguintes agentes etiológicos: *Escherichia coli* 29/36 (80,55%), *Klebsiella pneumoniae* 2/36 (5,55%), *Klebsiella oxytoca* 1/36 (2,77%), *Klebsiella ozaenae* 1/36 (2,77%), *Enterobacter agglomerans* 1/36 (2,77%), *Acinetobacter lwoffii* 1/36 (2,77%) e *Serratia marcescens* 1/36 (2,77%), representados na Fig. 4.

A Fig. 5 mostra que os microrganismos isolados das uroculturas positivas foram mais susceptíveis a Ofloxacina 32/34 (94,11%), seguido da Gentamicina 26/32 (81,25%), Nitrofurantoina 25/35 (71,42%) e Ácido Nalidíxico 18/26 (69,23%).

A Fig. 6 mostra os antimicrobianos aos quais os uropatógenos apresentaram maior resistência: Ampicilina 25/36 (69,44%), seguido da associação Sulfametaxazol-Trimetropim 21/33 (63,63%) e Amoxicilina-Ácido Clavulânico 9/36 (25%).

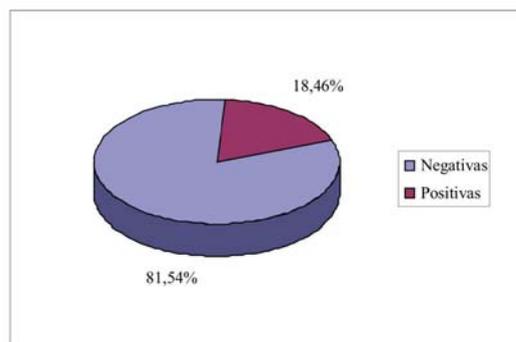


Figura 1 - Percentual de uroculturas positivas realizadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS, no período de outubro de 2006 a outubro de 2007.

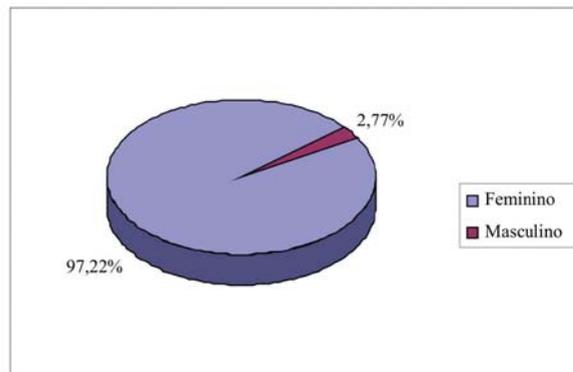


Figura 2 - Distribuição das ITU em relação ao sexo dos pacientes.

DISCUSSÃO

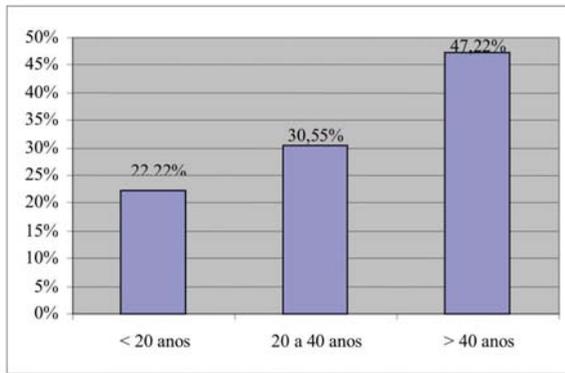


Figura 3 - Distribuição das ITU em relação à idade dos pacientes.

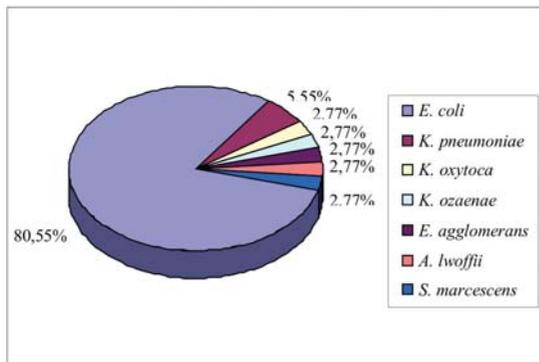


Figura 4 - Percentual de microrganismos isolados das uroculturas positivas.

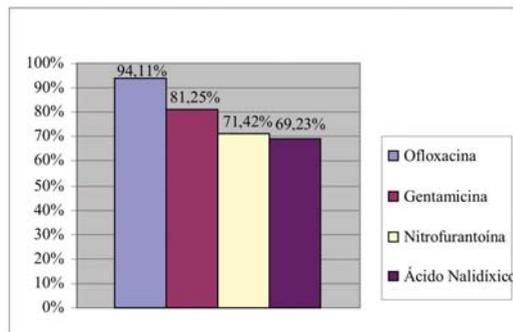


Figura 5 - Percentual de susceptibilidade dos uropatógenos aos antimicrobianos.

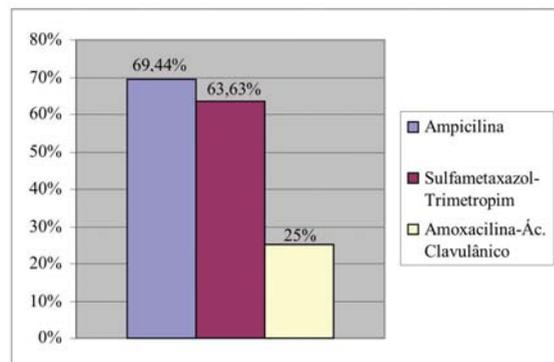


Figura 6 - Percentual de resistência dos uropatógenos aos antimicrobianos.

A infecção do trato urinário é uma patologia freqüente na clínica médica. Entre as 195 uroculturas realizadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS, foi evidenciado um predomínio de ITU no sexo feminino (97,22%) com idade acima de 40 anos (47,22%). Estes resultados são concordantes com estudos prévios.¹⁹ As mulheres são mais susceptíveis a este tipo de infecção devido a diversos fatores, entre eles podemos incluir o ato sexual, menopausa e gestação.¹² Outros fatores seriam o comprimento da uretra e a sua localização próxima da região perianal, facilitando a ascensão de microrganismos.²⁰

Nos homens, foi evidenciado que as ITU são menos freqüentes, representando apenas 2,77% dos casos. Isto deve-se ao fato de possuírem uretra mais longa e pela ação antibacteriana do líquido prostático. Quando ocorrem tais infecções, podem estar relacionadas a problemas mais complexos, como cálculo vesicular, cateterismo, diabetes e obstruções da próstata.^{4,17}

No que se refere à etiologia, a *Escherichia coli* foi a bactéria mais freqüentemente isolada, totalizando 80,55% dos casos. Vários autores confirmam que a *E. coli* é o principal responsável pelas ITU.^{1,2,9} Este microrganismo pertence à flora normal do intestino humano, podendo contaminar, colonizar e conseqüentemente causar infecções extra-intestinais, sendo o principal agente etiológico das infecções urinárias.³

A infecção causada por *Klebsiella* sp., a qual representou o segundo microrganismo mais isolado neste estudo, também é outro índice encontrado na literatura.^{1,19}

As bactérias isoladas nas uroculturas foram testadas frente a uma série de antimicrobianos. O perfil de susceptibilidade indicou a Ofloxacina como um dos melhores agentes antimicrobianos frente aos microrganismos isolados, os quais apresentaram-se sensíveis a este antimicrobiano em 94,11% dos casos. Os uropatógenos também apresentaram alta sensibilidade à Gentamicina (81,25%), à Nitrofurantoína (71,42%) e ao Ácido Nalidixico (69,23%). Esses antimicrobianos mostram-se eficazes contra muitos microrganismos aeróbicos Gram-negativos,¹⁸ sendo que a Nitrofurantoína geralmente é considerada uma alternativa no tratamento das ITU não complicadas.⁷

Os uropatógenos isolados neste estudo apresentaram maior índice de resistência à Ampicilina (69,44%), indicando que este fármaco deve ser utilizado somente frente ao resultado do antibiograma. A taxa de resistência ao Sulfametaxazol-Trimetropim foi de 63,63%. A resistência ao Sulfametaxazol-Trimetropim tem aumentado em todo o mundo, limitando seu uso como tratamento empírico.⁷ Uma notável diminuição na susceptibilidade dos uropatógenos frente a estes antimicrobianos já era observada desde o final da década de 80. Winstanley *et al.*²¹, relataram resistência de 30% ao Sulfametaxazol-Trimetropim para as enterobactérias. O terceiro maior índice de resistência apresentado pelos microrganismos foi de 25% para a associação Amoxicilina-Ácido Clavulânico. Esta associação apresenta maiores índices de susceptibilidade quando comparado com a utilização da Amoxicilina isoladamente,³ o que não evidenciou-se neste estudo.

É importante ressaltar que todas as uroculturas analisadas foram monomicrobianas, uma vez que infecção polimicrobiana verdadeira é rara, exceto em pacientes com bexiga neurogênica, abscessos crônicos ou cateteres de demora.⁶

CONCLUSÕES

Podemos concluir que estudos que avaliam as ITU são de

muita valia, pois permitem a aplicação de um tratamento mais adequado.

A urocultura quantitativa e o TSA (Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos) representam os melhores tipos de exame para o diagnóstico de ITU, pois permitem o isolamento, a identificação do microrganismo infectante e a determinação da sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos. O perfil da sensibilidade de amostras clínicas a antimicrobianos pode variar bastante, de acordo com a localidade, idade dos pacientes, sexo, dentre outras variáveis, e ainda sofre influência na maneira como os antimicrobianos são utilizados em uma determinada região geográfica. Assim, torna-se importante o conhecimento da prevalência e perfil de susceptibilidade dos patógenos locais, pois esses dados podem ser muito úteis na orientação da terapêutica empírica e na avaliação de novos antimicrobianos a serem introduzidos no mercado.

Também torna-se importante a educação e a prática do uso racional e prudente dos antimicrobianos, evitando assim, vários casos de resistência. Isso se refere não apenas à indicação e à escolha do fármaco em si, mas também à dose, aos intervalos de administração e à duração do tratamento.

AGRADECIMENTOS

À Christine Bonissoni Biasus, Farmacêutica responsável pelo Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS.

REFERÊNCIAS

1. BIANCO, G.; MACHADO, A. L.; PETRY, J. L. Padrões de sensibilidade e resistência da *E. coli* frente a nove antimicrobianos em comunidades no Rio Grande do Sul. *Rev. Phar. Brás.*, 14 (9/10): 82-87, 2002.
2. CAMARGO, I. L. B. 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.
3. CARS, O.; MOLSTAD, S.; MELANDER, A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet.*, 357: 1851-853, 2001.
4. CRUZ, J.; ROMÃO, J. J. E. Infecções do trato urinário. 3. ed. São Paulo: Ateneu, 1998.
5. DIAS, A. M. G.; KANO, E.; NAKAHARA, L. K.; FERNANDES, S. A.; KATO, M. A. M. F.; IRINO, K. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid. *Rev. Microbiol.*, 25 (2): 77-82, 1998.
6. DUARTE, G.; MARCOLIN, A. C.; GONÇALVES, C. V.; QUINTANA, S. M.; BEREZOWSKI, A. T.; NOGUEIRA, A. A.; CUNHA, S. P. Infecção Urinária na Gravidez: Análise dos Métodos para Diagnóstico e do Tratamento. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 24 (7): 471-477, 2002.

7. GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann. Intern. Med.*, 135 (1): 41-50, 2001.
8. HASENACK, B. S.; MARQUEZ, A. S.; PINHEIRO, E. H. T.; GUILHERME, R. L.; FRASSON, F. T.; AVELAR, G. S. Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário? *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 36 (3): 163-166, 2004.
9. HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – ITU. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 49 (1): 109-116, 2003.
10. HENRY, J. B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999.
11. HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 11: 551-581, 1997.
12. IDE, E.; SANTOS, S. P.; GRILLO, J. M.; PRADO, N. G. Síndrome uretral, infecções urinárias recorrentes e uretrotomia interna. *J. Bras. Urol.*, 6 (2): 142-145, 2000.
13. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Diagnóstico Microbiológico. 5. ed. São Paulo: Medsi, 2001.
14. LOPES, H. V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 51 (6), 2005.
15. MOURA, R. A. Técnicas de laboratório. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
16. NETTO, M. R.; CLARO, J. A. Infecções urinárias no homem. *Rev. Bras. Med.*, 54: 178-183, 1999.
17. ORENSTEIN, R. D. O.; WONG, E. M. D. Urinary tract infections in adults. *American Fam. Physician.*, 1, 1999.
18. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
19. SANTOS, R. C. V.; LUNARDELLI, A.; CASTAMAN, T. A.; NUNES, F. B.; PIRES, M. G. S.; OLIVEIRA, J. R.; WACHTER, P. H. Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 35 (1): 27-28, 2003.
20. VALIQUETTE, L. Urinary tract infections in women. *Can. J. Urol.*, 8: 6-12, 2001.
21. WINSTANLEY, T. G.; LIMB, D. I.; EGGINGTON, R.; HANCOCK, F. A 10 year survey of the antimicrobial susceptibility of urinary tract isolates in the UK: the Microbe Base project. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (4): 591-594, 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Neiva Aparecida Grazziotin
Rua Carlos Gomes 649/602
Passo Fundo - RS
CEP: 99070 - 060
E-mail: neivagra@uri.com.br



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br