

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Implantação de um protocolo laboratorial para o diagnóstico de mucopolissacaridoses VI e VII.....	83
<i>Gustavo Monteiro VIANA; Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ; Clebson Pantoja PIMENTEL; Isabel Cristina Neves de SOUZA; Luiz Carlos SANTANA-DA-SILVA</i>	
<i>Evaluation of a laboratorial protocol for mucopolysaccharidosis VI and VII</i>	
Avaliação do tratamento da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica, em hemodiálise, em uso de eritropoetina, ferro oral e endovenoso.....	87
<i>Carla Solange de Melo ESCÓRCIO; Herivaldo Ferreira da SILVA; Geraldo Bezerra da Silva JUNIOR; Mirian Parente MONTEIRO; Romélia Pinheiro GONÇALVES</i>	
<i>Evaluation of anemia treatment with epo and oral and iv iron in patients with chronic kidney disease under hemodialysis</i>	
Papiloma Vírus Humano (HPV).....	91
<i>BRAGAGNOLLO, A.L.; ELI, D.; HAAS, P.</i>	
<i>Human Papilloma Virus (HPV)</i>	
Estudo comparativo entre a prova da fosfatase alcalina e a análise microbiológica de leite humano processado em banco de leite do Recife - PE.....	97
<i>Elma Freitas do Nascimento; Maria do Rosário de Fátima Padilha</i>	
<i>Comparative study between the test of the alkaline fosfatase and the microbiological analysis of human milk processed at milk bank of Recife - PE</i>	
Controle de qualidade de técnicas realizadas nos laboratórios de parasitologia da secretaria municipal de saúde do município de Salvador, Bahia.....	101
<i>Souza R.F.; Amor A.L.M.</i>	
<i>Quality control of the parasitological techniques used in the laboratories of clinical analyses of the department of health of the Salvador city, Bahia</i>	
Efeito de diferentes tipos de exercício físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos no plasma de mulheres após a menopausa.....	107
<i>Noler Heyden Flausino; Lorena Rocha Ayres; Stella Maris da Silveira Duarte; Livia Mara Santos; Maria Fernanda Chiattoni; Poliana de Oliveira; Fernanda Borges de Araújo Paula</i>	
<i>Different exercise approaches on the oxidative stress and biochemical markers of women plasma after menopause</i>	
Níveis de antígeno prostático específico (PSA) em indivíduos com diferentes hábitos alimentares.....	111
<i>Valéria Cristina Ribeiro Dantas, Ralfo Cavalcante de Medeiros, Luciana Vilar de Sales Rocha, Ana Angélica de Lacerda Rocha, Laura Lidia Serique Gato Lamarão, Pâmela Danuta Costa Fernandes, Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino</i>	
<i>Specific prostate antigen levels (PSA) in individuals with different alimentary habits</i>	
Determinação sérica de lipídeos: variações interlaboratoriais.....	115
<i>Elaine Cristina Cabral, Glausiani Erbs da Costa, Edneia Casagrande Bueno, Juliana Bernardon Pretto Gonçalves, Darlene Camati Persuhn</i>	
<i>Determination serica of lipids: variations interlaboratoriais</i>	
Análise dos polimorfismos HLA-DQB1*0201/DQB1*0302 em pacientes portadores de diabetes melito tipo 1 no vale do sino.....	119
<i>Priscila T Azambuja; Sabrina E M Almeida; Daiane D Berlese; Regina B Barcelos</i>	
<i>Analysis of the HLA-DQB1*0201/DQB1*0302 polymorphisms in type 1 diabetes mellitus brazilian patients</i>	
Microbiota fúngica do solo e ar atmosférico na região da Borborema, estado da Paraíba, Brasil.....	123
<i>Filipe de Oliveira Pereira, Edeltrudes de Oliveira Lima, Kelly Rejane Leite de Figueiredo, Lizandro Leite Brito, Assuero Silva Meira</i>	
<i>Fungal microbiota from the soil and atmospheric air in the region of Borborema, Paraíba state, Brazil</i>	
Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cérvico-vaginal.....	127
<i>Márcia Mayumi Ito; Simone Maria de Vargas; Linda Emiko Suzuki, Júlio Cezar Merlin</i>	
<i>Dimension of the human Papilomavirus (HPV) participation in the cervix-uterine cancer evolution</i>	
A Incidência de Papilomavírus Humano em Mulheres no Hospital Universitário Sul.....	131
<i>Tainá Carneiro de Castro Monte, Gustavo Lopes Peixoto</i>	
<i>The presence of Human Papilomavirus infection in Women at Sul Fluminense University Hospital</i>	
Perfil de sensibilidade de <i>salmonella sp.</i> De ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais.....	141
<i>Caroline Evelin Nascimento Kluczynik, Joelly Holanda de Souza, Josman Dantas Palmeira, Sávio Benvindo Ferreira, Rossana Miranda Pessoa Antunes, Thálio Antunes de Arruda, Maricelma Ribeiro Moraes & Raissa Mayer Ramalho Catão</i>	
<i>Profile of sensitivity of <i>salmonella sp.</i> Of water environment for commercial antimicrobials and the hydroalcoholic extracts of medical plants</i>	
Avaliação dos efeitos do hipotireoidismo na gestação.....	145
<i>Natália Barth; Bianca Pizzolotto da Costa; Fábio Kerber Slongo; Mabel Cristina Nascimento; Gustavo Müller Lara</i>	
<i>Avaliation of hypothyroidism effects in pregnancy</i>	
Perfil Sorológico da Toxoplasmose na Grande João Pessoa/PB.....	149
<i>Carlos Eduardo de Oliveira Costa Junior & Cristine Hirsch Monteiro</i>	
<i>Serologic Profile of Toxoplasmosis in João Pessoa/PB</i>	

E mais...

Temas Livres do 37º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2010
e do 10º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

2

VOLUME 42

2010

Implantação de um protocolo laboratorial para o diagnóstico de Mucopolissacaridoses VI e VII*

Evaluation of a laboratorial protocol for Mucopolysaccharidosis VI and VII

Gustavo Monteiro VIANA¹; Camila de Britto Pontes Rodrigues PARÁ¹; Clebson Pantoja PIMENTEL¹; Isabel Cristina Neves de SOUZA²; Luiz Carlos SANTANA-DA-SILVA³

RESUMO - As Mucopolissacaridoses (MPS) correspondem a um grupo de doenças genéticas raras caracterizadas pela deficiência/ausência de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos (GAG). Uma vez não degradados, os GAG se acumulam em diversos tecidos do organismo, causando uma série de complicações patológicas, que iniciam desde o período fetal até a fase infantil. Foi realizada a implantação de um protocolo laboratorial para o diagnóstico de pacientes com MPS, através da mensuração da atividade de duas enzimas lisossomais: beta-glicuronidase e arilsulfatase B, deficientes nas MPS VII e VI, respectivamente. Os valores encontrados em indivíduos normais corresponderam aos valores de referência descritos para a doença. Um paciente com suspeita clínica de MPS demonstrou níveis normais de ambas as enzimas, o que exclui a possibilidade do mesmo possuir MPS VI ou VII. A implantação de protocolos laboratoriais de mensuração enzimática na investigação de MPS permite a realização de diagnósticos mais rápidos e, dessa forma, pode contribuir para as condutas clínicas mais apropriadas.

PALAVRAS-CHAVE - Mucopolissacaridoses, Beta-glicuronidase, Arilsulfatase B, Diagnóstico enzimático.

SUMMARY - Mucopolysaccharidosis (MPS) are a group of genetic diseases caused by a deficiency of some specific lysosomal hydrolases, which promote the glycosaminoglycans (GAG) degradation. Since they were not degraded, it leads to a cellular/organic complication due to the storage of these molecules which are responsible for the majority of pathologic alterations from birth to young age. The aim of this study was to establish two enzymatic activity measurement protocols [arylsulfatase B (ARSB) and beta-glucuronidase (GUSB)] to the diagnosis of Mucopolysaccharidosis VI and VII, respectively. The GUSB activity was determined on plasma and leukocytes by the synthetic 4-methylumbeliferil- β -D-glucuronide substrate assay and the ARSB leukocyte activity by 4-nitrocathecol photocolometric assay. The leukocyte enzyme values encountered in healthy controls were according to the normal range (GUSB: 23 to 151 nmoles/h/mg prot; ARSB: 72 to 176 nmoles/h/mg prot). Plasma values are also in the normal range (GUSB: 30 to 300 nmoles/h/mg prot). One patient with suspect of MPS has shown normal values of both enzymes. The evaluation of laboratorial protocols of lysosomal enzymes measurements allows faster and costless diagnostics and, consequently, appropriated clinical procedures.

KEYWORDS - Mucopolysaccharidosis; Arylsulphatase B; Beta-glucuronidase; Enzymatic diagnosis.

INTRODUÇÃO

As Mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo de doenças lisossômicas de depósito (DLD), causadas pela deficiência de enzimas lisossomais essenciais para o metabolismo de componentes da matriz extracelular como os glicosaminoglicanos (GAG). Uma vez não degradados, os GAG são estocados nos compartimentos lisossômicos das células, promovendo uma série de complicações patológicas que iniciam desde o período fetal, até a intensa progressão dos sintomas na fase infantil (Scriver *et al.*, 2001). Apesar de apresentarem, em comum, características crônicas e progressivas, os sintomas apresentados por pacientes de MPS variam de acordo com o tipo. Dentre os sintomas descritos estão organomegalia, disostose múltipla, hepatoesplenomegalia, mão em garra e facies grosseiras. A audição, visão, respiração, funções cardiovasculares e a mobilidade podem, também, estar eventualmente comprometidas. A deficiência mental profunda é característica de pacientes com MPS IH (Síndrome de Hurler), com a forma grave da MPS II (Síndrome de Hunter) e de todos os tipos de MPS III (Síndrome de Sanfilippo). Já as MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) e MPS II (forma moderada) não possuem, geralmente, comprometimento mental. Problemas ósseos são mais comumente descritos na MPS IV ou Síndrome de Mórquio (Neufeld & Muenzer, 2001). As MPS possuem uma incidência estimada em 1:10000 e 1:25000 recém-nascidos. As MPS I e II são consideradas as mais frequentes, enquanto a MPS III parece ser o tipo mais raro. Todas as MPS, com exceção da MPS II são herdadas

de forma autossômica recessiva. A MPS II possui herança ligada ao X (Solion, 1996; Nelson, 1997; Meikle *et al.*, 1999). Em função da escassez de centros de referência para a investigação de doenças genéticas raras e à falta de informação dos médicos, as MPS ainda são pouco diagnosticadas. Entretanto, a partir de 1990, com a implantação de novos centros de referência, esse retrospecto vem mudando gradativamente. Schwartz *et al.* (2002) verificaram, no Brasil, uma variação na frequência dos tipos de MPS de acordo com a região do país, com casos de MPS I aparentemente mais frequentes e casos de MPS VII mais raros. O diagnóstico laboratorial das MPS é realizado, inicialmente, através de testes de triagem, como o brometo de cetil trimetil-amônio (BCTMA) e o teste do Azul de Toluidina, os quais permitem avaliar, qualitativamente, uma possível excreção de GAG na urina. Caso seja observada positividade nestes testes, protocolos mais específicos, como a cromatografia e a dosagem de GAG, são realizados para identificação dos grupos de GAG excretados e, assim, verificar qual a MPS possivelmente relacionada. O diagnóstico laboratorial definitivo é fornecido através da mensuração da atividade de enzimas lisossomais a partir de leucócitos e/ou fibroblastos do paciente (Wajner *et al.*, 2001). O presente estudo teve como objetivo implantar, no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPa), um protocolo laboratorial para o diagnóstico das MPS VI e VII, através da mensuração da atividade das enzimas arilsulfatase B (ARSB; E.C.: 3.1.6.12) e beta-glicuronidase (GUSB; E.C. 3.2.1.31), respectivamente.

Recebido em 09/10/2008

Aprovado em 05/10/2010

*Trabalho realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (LEIM/ICB/UFPa)

¹Biomédicos, Mestrandos do PPG em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará; ²Médica Pediatra do Hospital Universitário Bettina de Ferro Souza da Universidade Federal do Pará (HUBFS/UFPa); ³Biomédico, chefe do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade Federal do Pará (LEIM/ICB/UFPa)

Fontes financiadoras: PROEX/UFPa, SEDECT/FAPESPA e GENZYME DO BRASIL

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras estudadas

Para a padronização dos ensaios enzimáticos, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 30 indivíduos sadios voluntários, homens e mulheres, com faixa etária de 18 a 50 anos e de um paciente com suspeita clínica de MPS.

Coleta do sangue periférico

Foram coletados 10 mL de sangue periférico de cada indivíduo voluntário através de punção venosa. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado com anticoagulante heparina e armazenado a 4° C.

Separação do plasma (GUSB)

Do volume total de sangue coletado (10 mL), foram retirados 3 mL para separação do plasma através de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Após esse tempo, o plasma foi retirado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Separação de leucócitos (GUSB e ARSB)

A separação de leucócitos foi realizada segundo a metodologia descrita por Skoog *et al.* (1956).

Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951).

Determinação das atividades enzimáticas (GUSB e ARSB)

As atividades enzimáticas das enzimas GUSB e ARSB foram avaliadas através dos métodos fluorimétrico (Beudet *et al.*, 1975) e fotolorimétrico (Kresse *et al.*, 1982), respectivamente.

Análise Estatística

Para verificar possíveis diferenças significativas entre os níveis das enzimas GUSB e ARSB em cada amostra, foi utilizada como ferramenta estatística o teste "t" de Student através do programa BioStat 4.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as variações dos níveis plasmáticos e leucocitários da GUSB. Em relação aos níveis plasmáticos, os valores de atividade enzimática variaram entre 16,6 a 147,14 nmoles/h/mL, com uma média de $43 \pm 23,8$ nmoles/h/mL. A atividade enzimática leucocitária da GUSB variou entre 23 a 113 nmoles/h/mg prot., com um valor médio de $51,8 \pm 21,2$ nmoles/h/mg prot. Em relação a ARSB, os níveis enzimáticos leucocitários variaram entre 32,3 a 258,79 nmoles/h/mg de proteína, (média: $104,12 \pm 66,8$), como demonstrado na figura 03.

A variação dos níveis de atividade enzimática entre os indivíduos pertencentes aos grupos controles das enzimas GUSB e ARSB não foi significativa, correspondendo aos valores de referências previamente obtidos por outros centros de diagnóstico ($p > 0,05$).

Os valores de atividade enzimática da GUSB e da ARSB encontrados na amostra do paciente com suspeita clínica de MPS foram considerados dentro dos valores de referência (GUSB: 181,23 nmoles/h/mg prot; ARSB: 178,91 nmoles/h/mg prot), não havendo, portanto, diferença significativa entre estes valores e os encontrados no grupo controle de ambas as enzimas (quadro 1).

DISCUSSÃO

O diagnóstico de MPS é caracterizado através da avaliação clínica, baseada na investigação de possíveis comprometimentos orgânicos e da avaliação laboratorial. A avaliação laboratorial consiste em uma seqüência de protocolos de investigação bioquímica, os quais compreendem desde teste de triagem (BCTMA, Teste do Azul de Toluidina, cromatografia de GAG em camada delgada e dosagem de GAG urinários) até testes mais específicos como dosagens enzimáticas. Mais especificamente, para o diagnóstico de MPS VI e VII, são utilizados protocolos de dosagem das enzimas ARSB e GUSB, respectivamente, em diversos tecidos e fluidos biológicos.

Os valores de atividade enzimática encontrados no plasma e em leucócitos dos indivíduos controle corresponderam aos valores de referência descritos pela literatura (Beudet *et al.*, 1975; Kresse *et al.*, 1982). Apesar de algumas discrepâncias entre os valores, a média geral permaneceu dentro do intervalo de referência. Tais diferenças podem estar relacionadas a muitas variáveis, uma vez que ensaios enzimáticos apresentam muitas variações, por fatores ambientais, sensibilidade da técnica, calibração dos aparelhos utilizados entre outros (Scriver *et al.*, 2001).

Em função da reduzida quantidade de amostra coletada do paciente com suspeita de MPS, só foi possível realizar a mensuração da atividade leucocitária das enzimas GUSB e ARSB.

Através do protocolo de dosagem enzimática, foi possível descartar a hipótese de MPS VI e MPS VII para o paciente com suspeita de MPS, uma vez que as enzimas responsáveis por essas duas doenças (ARSB e GUSB, respectivamente) foram encontradas com níveis de atividade dentro dos valores de referência. Entretanto, o mesmo paciente demonstrou um alta taxa de excreção de GAG na urina (25,64 µg/mmol de creatinina; dados não publicados), além de resultados positivos nos testes de BCTMA e azul de toluidina, o que não exclui a possibilidade da presença de um outro tipo de MPS. Além disso, a discreta elevação da atividade enzimática da ARSB encontrada em leucócitos do paciente com suspeita de MPS parece ser um padrão celular típico em pacientes com MPS, pois apesar dos mecanismos pelos quais essa "compensação enzimática" ainda não serem totalmente esclarecidos, estudos indicam que o aumento de tamanho dos lisossomos ou a estabilização de enzimas em função do acúmulo de substâncias intralisossomais podem refletir numa descompensação da atividade de outras hidrolases lisossomais (Clarke *et al.*, 2008).

Novos protocolos de mensuração enzimática que utilizam menores quantidades de reagentes e de amostras estão sendo desenvolvidos pelos principais centros de referência para o diagnóstico de DLD. Técnicas como a mensuração da atividade enzimática em papel filtro, descrita por Civallero *et al.* (2006) surgem como novas perspectivas para a triagem de diversas patologias, através de métodos simples, rápidos e de baixo custo.

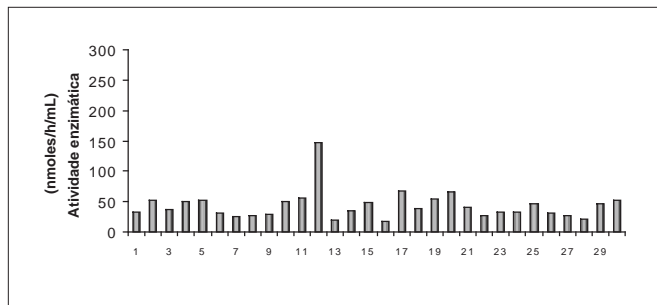


Figura 1: Atividade enzimática da GUSB plasmática em indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 16 – 147 nmoles / h / mL.

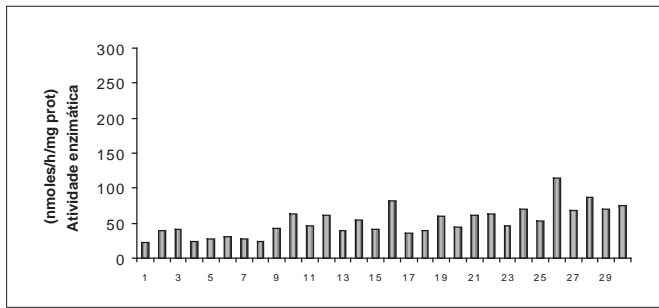


Figura 2: Atividade da enzima GUSB leucocitária de indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 23 – 113 nmoles / h / mg prot.

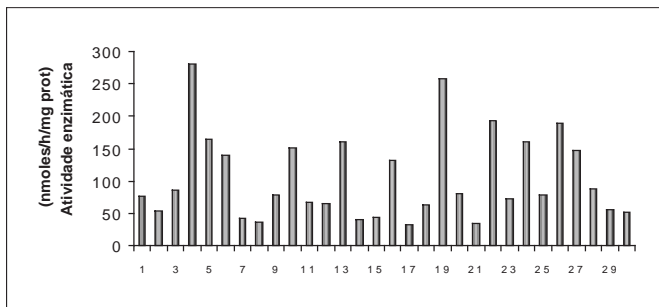


Figura 3: Atividade da enzima ARSB leucocitária em indivíduos do grupo controle (n=30). Valores encontrados: 32 – 280 nmoles / h / mg prot.

enzimas	Atividade plasmática (nmoles/h/ml) (média±DP)		Atividade leucocitária (nmoles/h/mg prot) (média±DP)	
	Controle (n=30)	MPS não determinada (n=1)	Controle (n=30)	MPS não determinada (n=1)
GUSB	43±23,8	-	51±21,2	181,23
ARSB	-	-	104±66,8	178,91

Valores de referência: GUSB (plasma): 30 – 300 nmoles / h / mL; GUSB (leucócitos): 23 – 151 nmoles / h / mg prot; ARSB (leucócitos): 72 – 176 nmoles / h / mg prot. *p < 0,05.

QUADRO 1: Atividade enzimática de GUSB e ARSB em indivíduos do grupo controle e em um paciente com suspeita clínica de MPS.

CONCLUSÕES

O diagnóstico enzimático para MPS, além de ser definitivo, é capaz de diferenciar qual subtipo da doença o paciente manifesta e, assim, fornecer uma orientação na elaboração de protocolos terapêuticos adequados.

A implantação de um protocolo enzimático para investigação de MPS no LEIM/ICB/UFPA tornou-se fundamental haja vista a necessidade da realização de um diagnóstico laboratorial definitivo para pacientes com essa doença na região Norte do país.

Em função disso, o LEIM/ICB/UFPA consolida-se como um centro de referência regional no diagnóstico para MPS, aumentando a rede nacional de apoio na identificação e tratamento de doenças metabólicas hereditárias, juntamente com outros centros de referência do país.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos os participantes do estudo e aos órgãos financiadores (PROEX/UFPA, SEDECT/FAPESPA e GENZYME DO BRASIL) por permitirem a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

BEAUDET, A.L.; DIFERRANTE, N.M.; FERRY, G.D.; NICHOLS, B.L. & MULLINS,

- C.E. Variations in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency. *Journal of Pediatrics*, 86:388, 1975.
- BOND, C.S.; CLEMENTS, P.R.; ASHBY, S.J.; COLLYER, C.A.; HARROP, S.J.; HOPWOOD, J.J.; GUSS, J.M. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*. 5:277-289, 1997.
- CIVALLERO, G.; MICHELIN, K.; DE MARI, J.; VIAPIANA, M.; BURIN, M.; COELHO, J.C.; GIUGLIANI, R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*. 372:98-102, 2006.
- GIBSON, G.J.; SACCONI, G.T.P.; BROOKS, D.A.; CLEMENTS, P.R.; HOPWOOD, J.J. Human N-acetylgalactosamine-4-sulphate sulphatase. *Biochemical Journal* 248:755-764, 1987.
- CLARKE, L.A. The mucopolysaccharidosis: a success of molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(1), 2008.
- HAMARTZ, P.; WHITLEY, C.B.; WABER, L.; PAIS, R.; STEINER, R.; PLECKO, B.; KAPLAN, P.; SIMON, J.; BUTENSKY, E.; HOPWOOD, J. Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *The Journal of Pediatrics*. 144(5):574-580, 2004.
- KRESSE H.; VON FIGURA, K.; KLEIN, U.; GLOSSI, J.; PASCHKE, E.; POHLMANN, R.; Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods of Enzymology*; 83:559, 1982.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-75, 1951.
- LOWRY, R.B. & RENWICK D.H.G. Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *The New England Journal of Medicine*, 284: 221-222. 1971
- LOWRY, R.B.; APLEGARTH, D.A., TOONE, J.R., MACDONALD, E. & THUNEM, N.T. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Human Genetics*, 85: 389-390. 1990
- MEIKLE, P.J.; HOPWOOD, J.J.; CLAGUE, A.E.; et al. Prevalence of lysosomal storage diseases. *JAMA*, 28:249-254, 1999.
- MICHELIN, K. Estudos bioquímicos com a glicocerebrosidase de indivíduos com Doença de Gaucher: Comparação com a enzima de indivíduos normais. *Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001. p123.
- NELSON, J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Human Genetics*, 101:355-358, 1997.
- NEUFELD, E.F. & MUENZER J. In: *Metabolic and Molecular bases of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. New York: McGraw Hill; 2001.
- SCRIVER C.R.; BEAUDET A.L.; SLY, W.S. & VALLE, D. *The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 2001.
- SCHWARTZ, I.V.D.; MATTE, U.S.; ARTIGALAS, O.; BROILLO, F.; BURIN, G.M.; GIUGLIANI, R. MPS no Brasil: Estudos clínicos e Dados Epidemiológicos [online]. Disponível em http://www.hcpa.ufrgs.br/genetica_genetica@hcpa.ufrgs.br, 2002.
- SKOOG, W.A. & BECK W.S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood*, 11(5):436-54, 1956.
- SOLYON, E. Incidence data for Mucopolysaccharidoses in Hungary. In: 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and related diseases program. Wollongong (Austrália), p.75, 1996.
- SIDDHARTH, L.; SHARMA, A.; SHRIVASTAVA, G.P.; JAIN, S.K. Maroteaux-Lamy Syndrome. *Indian Journal of Pediatrics*. 71:933-936, 2004.
- WAJNER, M.; VARGAS, R.C.; BURN, G.M.; GIUGLIANI, R. & COELHO, J.C. Investigação de Erros Inatos do Metabolismo. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* 21 (3): 343-360, 2001.
- WEISSMANN, G.; ZURIER, R.B.; HOFFSTEIN, S. Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *American Journal of Pathology*. 68:539-566. 1972.
- WELLER, P.F. & AUSTEN, K.F. Human eosinophil arylsulfatase B. Structure and activity of the purified tetrameric lysosomal hydrolase. *The Journal of Clinical Investigation*. 71(1):114-23, 1983.
- WENGER, D.A.; COPPOLA, S.; LIU, S. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Archives of Neurology*, 60:322-328. 2007.
- WILCOX, W. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The Journal of Pediatrics*, 144:3-14. 2004.
- WILKINSON, J.H. Clinical significance of enzyme activity measurements. *Clinical Biochemistry*, 16: 882-890. 1970.
- WRAITH, J.E. Lysosomal disorders. *Semin. Neonatol*. 7:75-83. 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Gustavo Monteiro Viana
ICB - UFPA
Rua Augusto Corrêa 1
CEP. 66075-970 Belém - PA

Avaliação do tratamento da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica, em hemodiálise, em uso de eritropoetina, ferro oral e endovenoso

Evaluation of anemia treatment with epo and oral and iv iron in patients with chronic kidney disease under hemodialysis

Carla Solange de Melo ESCÓRCIO¹; Herivaldo Ferreira da SILVA²; Geraldo Bezerra da Silva JUNIOR³; Mirian Parente MONTEIRO⁴; Romélia Pinheiro GONÇALVES⁴

RESUMO - O objetivo do estudo foi avaliar comparativamente a evolução do tratamento da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), em hemodiálise, em uso de eritropoetina recombinante humana (EPO), tratados com ferro oral e ferro endovenoso em Fortaleza, Ceará, no período de janeiro de 2004 a janeiro de 2005. Tratou-se de estudo observacional descritivo em duas clínicas de hemodiálise em Fortaleza, Ceará. Os dados foram coletados a partir da consulta aos prontuários e mapas de exames realizados mensalmente pelos pacientes. De 165 casos selecionados, apenas 89 (54%) compuseram o banco de dados da pesquisa. Deste total 63 (71%) pacientes estavam usando exclusivamente sulfato ferroso oral, 09 (10%) faziam uso exclusivo do sacarato de hidróxido de ferro III administrado por via endovenosa, e 17 (19%) faziam uso de ambos. Os parâmetros analisados durante o estudo foram: idade, sexo, tempo de diálise, doença de base, dosagem da hemoglobina, determinação do hematócrito, dosagens séricas do ferro sérico, ferritina sérica, índice de saturação da transferrina, capacidade latente e total de ligação do ferro. Analisando os parâmetros hematológicos concluiu-se que a anemia encontra-se bem controlada e estabilizada. Porém, a maioria dos pacientes apresentou ferritina sérica < 400ng/mL e índice de saturação da transferrina (IST) < 20%. Constatou-se que houve melhora da anemia nos pacientes com IRC em hemodiálise, tratados com EPO e ferro oral. Todavia, para otimizar o tratamento da anemia na IRC deve-se levar em consideração as complicações da doença de base, o grau da anemia, os estoques de ferro e os efeitos adversos relacionados a ferroterapia.

PALAVRAS-CHAVE - anemia, diálise renal, insuficiência renal crônica

SUMMARY - Background: The aim of this study is to evaluate comparatively anemia treatment in patients with chronic kidney disease (CKD) under hemodialysis, with human recombinant erythropoietin (EPO), oral iron supplements and/or intravenous iron in Fortaleza, Ceara, Brazil. Methods: It is an observational descriptive study. Data were gathered from medical records of patients followed in two hemodialysis centers in Fortaleza, Ceará, Brazil from January 2004 to January 2005. From 165 selected cases only 89 (54%) were included in the study due to available data. The majority of patients 62 (70%) were using exclusively oral ferrous sulfate, 9 (10%) were using only ferric hydroxide saccharate III conducted by intravenous route, and 18 (20%) were using both. The analyzed variables during the study were: age, sex, time of maintenance dialysis, morbidities, hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), determinations of plasma iron level (FeS), serum ferritin (FS), transferrin saturation index (IST), total and latent capacity of iron binding (CTLFe). Results: the results showed that the majority of patients presented diminished serum iron, normal serum ferritin and reduced transferrin saturation index (IST). In the comparative analysis it was verified, through ANOVA test, that there were no statically significant differences of Ht and Hb among the groups ($p > 0.05$). The chi-square test showed that there was no association of FS and IST between the groups ($p > 0.05$). Conclusion: it was verified that there was an improvement of anemia in patients with CKD under hemodialysis treated with EPO and oral iron supplements. However, to improve anemia treatment in CKD it is necessary to consider the complications of the baseline disease, the anemia level, iron stores and the adverse effects linked to iron therapy.

KEYWORDS - hemodialysis, chronic kidney disease, anemia treatment.

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) denota um estado de disfunção com perda progressiva e irreversível da função renal (glomerular, tubular e endócrina). No estágio mais avançado, fase terminal da insuficiência renal crônica, os rins não conseguem excretar os resíduos nitrogenados produzidos diariamente no organismo e/ou excretar ou reter água e eletrólitos necessários à manutenção do equilíbrio, surgindo hiperazotemia, acidose e anemia^{1,2,3,4}. A anemia da IRC é normocítica e normocrômica, segundo a classificação morfológica, que utiliza os índices hematimétricos clássicos, volume globular médio (VCM) e hemoglobina globular média (HCM), além de ser hipoproliferativa de acordo com a classificação fisiopatológica que utiliza o índice de produção dos reticulócitos (IPR)^{5,6,7,8}. A disponibilidade da eritropoetina recombinante humana (EPO) para tratamento da anemia do renal crônico melhorou substancialmente a qualidade de vida desses pacientes^{9,10}. No entanto, na maioria das vezes, a anemia é parcialmente corri-

gida, sendo responsável por sintomas como fadiga, diminuição da tolerância ao exercício e falência cardiovascular^{11,12,13}. Na IRC, a via subcutânea deve ser considerada a primeira escolha para administração da EPO durante a fase pré-diálise, por apresentar melhor relação custo/benefício, reque-rendo uma dose até 40% menor do fármaco. Por outro lado, nos pacientes mantidos em hemodiálise pode-se optar tanto pela via subcutânea quanto pela intravenosa^{14,15,16}. A suplementação com o ferro oral tem sido recomendada a todos os pacientes em uso de EPO, exceto para pacientes com sobrecarga de ferro. A disponibilidade de ferro é fundamental para o sucesso do tratamento da anemia em pacientes com IRC em hemodiálise. Para otimização do tratamento, no entanto, torna-se imprescindível monitorar os estoques de ferro rotineiramente e tratar adequadamente sua deficiência¹⁶. O objetivo do estudo foi de descrever e avaliar comparativamente a evolução do tratamento da anemia em pacientes com IRC, em uso de EPO, tratados com ferro oral e ferro endovenoso em duas clínicas de hemodiálise em Fortaleza, Ceará.

Recebido em 27/10/2008
Aprovado em 27/11/2009

¹Mestre em Farmácia Clínica. ²PhD, Médico do HEMOCE. ³Residente de Medicina Interna. ⁴PhD, Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Ceará / UFC

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes: no período de janeiro de 2004 a janeiro de 2005 foram estudados 89 pacientes atendidos em duas clínicas de hemodiálise, em Fortaleza, Ceará. Os critérios de inclusão foram pacientes com insuficiência renal crônica, em hemodiálise, que faziam uso de eritropoetina recombinante humana associada ao sacarato de hidróxido de ferro e/ou combinada com sulfato ferroso. Os critérios de exclusão foram pacientes com dados incompletos ou quando se recusaram a participar do estudo não assinando o termo de consentimento. De 165 casos selecionados, apenas 89 (54%) compuseram o banco de dados da pesquisa. Considerou-se como principal fonte de dados o prontuário. Quando o mesmo não apresentava todas as informações necessárias à pesquisa, a consulta estendia-se ao mapa mensal de resumo dos resultados dos exames laboratoriais. As variáveis foram: idade, sexo, doença pré-existente, tempo de diálise, hemoglobina, hematócrito, ferro sérico (FeS), ferritina e índice de saturação da transferrina (IST), capacidade latente de ligação do ferro (CLLFe) e capacidade total de ligação do ferro (CTLFe):

Estudo da Anemia: a dosagem da hemoglobina e a determinação do hematócrito foram obtidas por metodologia automatizada, ABOTT modelo CELL_DYN 3000. O tratamento da anemia foi estabelecido de acordo com os protocolos clínicos e terapêuticos adotados pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA).

Estudo do ferro: ferro sérico (Goodwin modificado), ferritina (Goodwin modificado), Capacidade latente de ligação do ferro (CLLFe) e capacidade total de ligação do ferro (CTLFe) e índice de saturação da transferrina (IST). Os valores de referência usados no estudo foram: ferro sérico 60-180 µg/dL, ferritina 10 a 80 ng/dL, CTLFe de 250-450µg/dL CLLFe de 140 a 280 µg /dL e IST 20-50%¹⁷.

Aspecto Ético: a pesquisa foi aprovada pelo comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará.

Análises Estatística: os dados foram analisados em programa SPSS versão 10.0 e planilha Excel 2000. Os resultados foram expressos através de média ± SD. A associação dos testes de qui-quadrado com nível de significância de 5% e ANOVA foram usados na análise estatística.

RESULTADOS

Um total de 89 pacientes com IRC em hemodiálise foram investigados em relação ao tratamento da anemia, sendo 33 (37,1%) mulheres e 56 (62,9%) homens. A maioria 62 (70%) foi tratada com suplementação de ferro oral (Grupo I), 9 (10%) com ferro endovenoso e 18 (20%) pacientes com ferro oral e endovenoso (Grupo III).

Os níveis de ferro estavam abaixo dos limites normais na maioria dos pacientes (Tabela 1), mas CLLFe aparece acima dos valores de referência em 20,7% dos pacientes (Tabela 2). Para dois pacientes do estudo foi impossível mensurar os valores para estes parâmetros clínicos, CLLFe e CTLFe (Tabela 2 e 3). A maioria dos pacientes apresentou valores de CTLFe no nível normal. (Tabela 3).

TABELA I
Valores do Ferro sérico

	Nº	%
Ferro sérico (µg/dL)		
< 60	68	76.4
60 - 180	21	23.6
TOTAL	89	100.0

Média: 49.11 ± 19.66

TABELA II

Valores da capacidade latente de ligação do ferro

	nº	%
CLLFe (µg/dL)		
< 140	3	3.5
140 - 280	66	75.9
> 280	18	20.7
TOTAL	87	100.0

Média: 234.73 ± 52.09

TABELA III

Valores da capacidade total de ligação do ferro

	nº	%
CTLFe (µg/dL)		
< 250	27	31.0
250 - 450	60	69.0
TOTAL	87	100.0

Média: 280.1 ± 56.49

Os dados laboratoriais de 62 pacientes em tratamento com suplementação de ferro oral mostraram valores médios de: Hb = 10.7g/dL, Ht = 32,7%, ferritina = 206,1 ng/dL e IST = 18,0% (Tabela 4). A idade média no primeiro grupo foi 50.71 anos e o tempo de diálise de 49.58 meses. Os parâmetros laboratoriais de 9 pacientes em tratamento com ferro endovenoso mostraram valores médios de: Hb = 10.3 g/dL, Ht = 31,5%, ferritina = 168.7 ng/dL e IST = 14.8% (tabela 4). A idade média no segundo grupo foi 40.24 anos e o tempo de diálise de 30.45 meses. Os parâmetros laboratoriais de 18 pacientes em tratamento com suplementação de ferro oral e ferro intravenoso mostraram valores médios de: Hb = 9.9 g/dL, Ht = 30.6%, ferritina = 271.5 ng/dL e IST = 18.7% (tabela 4). A idade média no terceiro grupo foi 53.56 anos e o tempo de diálise de 37.63 meses.

TABELA IV

Parâmetros laboratoriais dos 89 pacientes

VARIÁVEIS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	Valor do p*
Hemoglobina (Hb) (g/dL)**	10.7±1.54	10.3±1.45	9.9±1.37	>0.005
Hematócrito (Ht) (%)**	32.7±4.27	31.5±4.26	30.6±3.72	>0.005
Ferritina (ng/dL)*	206.1±218.73	168.7±179.43	271.5±184.89	>0.007
Índice de Saturação da Transferrina (IST) (%)*	18.0±7.12	14.8±5.57	18.7±11.72	>0.006

**ANOVA; *qui-quadrado; Média (± desvio padrão)

DISCUSSÃO

O presente estudo é do tipo observacional descritivo de abordagem quantitativa com o objetivo de descrever o tratamento da anemia em pacientes com IRC, em hemodiálise. A anemia é o principal fator limitante da capacidade física, intelectual e profissional do paciente com IRC, em hemodiálise. Acomete moderada ou gravemente 75% dos pacientes adultos e a quase totalidade das crianças. Embora a associação entre anemia e IRC tenha sido descrita por Richard Bright há mais de 150 anos, somente com o advento da EPO tornou-se possível entender o papel do rim e da EPO na sua fisiopatogenia. Ao longo destes últimos anos, a EPO vem sendo amplamente utilizada, mostrando-se eficaz em aproximadamente de 95% dos casos. Todavia, a deficiência de ferro é a principal causa de resposta inadequada a terapia com EPO. Assim, o tratamento com ferro tem sido recomendado para todos os pacientes tratados com EPO, exceto aqueles que apresentarem sobrecarga de ferro.

Neste estudo pôde-se constatar que as doenças de base que apresentaram maior prevalência em ordem decrescente foram: hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e glomerulonefrite. A hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus são exemplos de doenças sistêmicas que direta ou indiretamente podem comprometer a função renal. Por outro lado, a glomerulonefrite consiste em doença própria dos rins, podendo ter origem imunológica, congênita ou infecciosa.

Aproximadamente 70% dos pacientes avaliados faziam uso de sulfato ferroso oral. Alguns estudos sugerem que no renal crônico a absorção do ferro oral poderá estar normal ou diminuída. De fato, a suplementação oral apresenta absorção limitada em decorrência de determinados fatores gastrintestinais, tais como: azia, náuseas e diarreia, cuja incidência é 25%¹⁶. Apenas 10% dos pacientes avaliados faziam uso do sacarato de hidróxido de ferro III. Estudo comparativo com ferro oral e endovenoso mostrou que apenas o ferro endovenoso foi capaz de fornecer quantidades adequadas de ferro durante o tratamento com EPO. Singh *et al.* (2002) mostraram que mais de 30% do ferro endovenoso administrado ao paciente com IRC fica estocado nas células do sistema reticuloendotelial, tornando-o indisponível para a eritropoese. Assim, o paciente tratado com ferro endovenoso pode apresentar durante avaliação laboratorial deficiência de ferro, apesar de possuir ferro em estoque.

Em adição, cerca de 20% dos integrantes do estudo usaram ambas as formas de tratamento com ferro. Os pacientes deste grupo começaram tomando ferro oral e depois houve necessidade de substituição para o tratamento com ferro endovenoso. A intolerância gastrintestinal foi referida em cerca de 30% destes pacientes. Enquanto que 70% mudaram o tratamento devido ao fato de serem hiporresponsivos ao ferro oral, tendo que receber terapia endovenosa.

De uma forma geral, os pacientes apresentaram Ht de $32,23 \pm 4,23\%$ e Hb de $10,57 \pm 1,52$ g/dL. Diante destes valores observa-se que estes pacientes responderam satisfatoriamente ao tratamento com ferro e EPO, conseguindo atingir o alvo estabelecido pelo protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para tratamento de reposição e manutenção dos estoques de ferro em IRC da Secretaria Estadual de Saúde do Ceará (SESA-CE). Por conseguinte, sabe-se que valores de Ht acima de 30% e Hb de 12 g/dL estão estritamente relacionados com a remissão dos sintomas da anemia, com notável melhora da qualidade de vida do paciente com IRC, em hemodiálise.

Os parâmetros utilizados para avaliar os estoques de ferro foram Os seguintes: FeS, CLLFe, CTLFe, FS e o IST.

O FeS representa o ferro quelado à transferrina biologicamente disponível para ser fixado pelo tecido eritropoético e incorporado ao heme. Na IRC não é um parâmetro confiável, pois a interleucina-1 diminui a síntese de transferrina, reduzindo seus níveis. Neste estudo, 76,4% dos pacientes apresentaram FeS baixo e 23,6% normal.

A CLLFe consiste na capacidade residual da transferrina de ligar-se ao ferro, ou seja, é a capacidade total da transferrina de ligar-se ao ferro, subtraída do ferro já à ela quelado. Em geral, 3,45% dos integrantes da pesquisa apresentaram CLLFe diminuída, 75,86% normal e 20,69% aumentada.

Em adição, a CTLFe refere-se ao somatório do ferro quelado à transferrina e da capacidade residual da transferrina de ligar-se ao ferro. Assim, nesta pesquisa 31,03% dos participantes apresentaram CTLFe diminuída e 68,97% aumentada. Dois parâmetros comumente utilizados para avaliar os estoques de ferro na IRC são a FS e o IST. Como a ferritina é uma proteína de fase aguda do estado inflamatório, seus

níveis podem aumentar diante uma infecção e/ou inflamação e na uremia. Níveis de ferritina abaixo de 100 ng/mL representam deficiência absoluta de ferro em pacientes com IRC em hemodiálise. Todavia, alguns estudos demonstraram valores de Fs acima de 300 ng/mL coexistindo com deficiência de ferro. Em adição, o IST não necessariamente reflete os estoques de ferro, uma vez que está sujeito às grandes flutuações do FeS e da transferrina plasmática.

Dos 89 participantes do estudo, 62 tomaram exclusivamente ferro oral. A média do Ht foi de $32,66 \pm 4,27\%$ e da Hb foi $10,74 \pm 1,54$ g/dL. Observa-se que estes pacientes alcançaram os valores de Ht e Hb estabelecidos pelo protocolo da SESA-CE para o tratamento da anemia em pacientes com IRC. Assim, pôde-se constatar que para o tratamento da anemia da IRC o ferro oral pode ser tão efetivo quanto o endovenoso. Além disso, o tratamento por via oral apresenta vantagens como baixo custo, facilidade de administração e a não ocorrência de reações adversas de hipersensibilidade. No entanto, alguns pacientes podem apresentar intolerância gástrica ao ferro oral, o que pode limitar seu uso no renal crônico. É importante destacar ainda que, durante a ferroterapia na IRC é imprescindível avaliar o custo/benefício em cada paciente. Diante do exposto, fica claro que o ferro oral deve ser o tratamento de escolha para os pacientes renais em hemodiálise, devendo-se optar pela via parenteral somente na vigência de intolerância gástrica ou diante de deficiência absoluta ou função de ferro confirmada através da avaliação do ferro medular. Metade dos pacientes do grupo I apresentaram níveis de ferritina sérica entre 100 e 800 ng/mL. Em contraste, a grande maioria dos pacientes deste grupo (67,21%) apresentaram IST < 20%, não satisfazendo o objetivo da ferroterapia, que é manter este parâmetro entre 20 e 50%. Assim, observa-se que apesar dos integrantes deste grupo terem apresentado níveis ótimos de Ht e Hb, a avaliação dos estoques de ferro não revelou bons resultados.

Dos 89 participantes do estudo apenas nove fizeram uso exclusivo de ferro endovenoso. O sacarato de hidróxido de ferro III distribuído pelo Laboratório Althana Farma é a única apresentação de ferro endovenoso registrado e aprovada para uso no Brasil. As reações anafiláticas com o uso do sacarato ocorrem raramente e estima-se que a frequência seja proporcional à dose administrada e dependa da velocidade de infusão (DEFERRARI *et al.* 2002).

Os valores de Ht e Hb encontrados neste grupo foram, respectivamente: $31,49 \pm 4,26\%$ e $10,27 \pm 1,45$ g/dL. Analisando-se estes parâmetros pode-se observar que esta modalidade de tratamento alcançou os objetivos propostos no protocolo clínico para o tratamento da anemia da IRC. Por outro lado, os parâmetros utilizados para avaliar os estoques de ferro não apresentaram bons resultados, uma vez que, o IST em cerca de 80% dos integrantes deste grupo foi menor que 20%, ficando aquém dos valores estabelecidos pela SESA-CE.

Dezoito participantes desta pesquisa tomaram ferro oral e endovenoso. Estes pacientes iniciaram o tratamento da anemia com ferro oral e depois passaram a fazer uso de suplementação endovenosa. Os integrantes deste grupo apresentaram $30,62 \pm 3,72\%$ de Ht e $9,92 \pm 1,37$ g/dL de Hb. Então, diante destas observações, pode-se concluir que o ferro endovenoso foi decisivo para otimizar o tratamento da anemia. Sabe-se, no entanto, que o ferro endovenoso é o tratamento mais efetivo para correção da anemia associada à IRC em pacientes em hemodiálise. Porém, as reações adversas de hipersensibilidade podem ocorrer com o uso do ferro endovenoso, o que não se aplica ao ferro oral.

Por ocasião do estudo, fez-se uma análise comparativa e constatou-se pelo teste ANOVA que não houve diferenças estatisticamente significativas do Ht e da Hb entre os grupos ($p > 0,05$). Pelo teste qui-quadrado verificou-se que não houve associação do IST e da FS entre os grupos ($p > 0,05$). Os resultados deste estudo indicam que o uso do ferro para a correção da anemia em pacientes com IRC em Fortaleza, Ceará está sendo efetivo independentemente da formulação farmacêutica empregada. Porém, para otimizar o tratamento é necessário monitorar rotineiramente os estoques de ferro e tratar adequadamente sua deficiência.

Constatou-se que o tratamento da anemia em pacientes com IRC em hemodiálise obedece aos critérios clínicos estabelecidos pela SESA-CE para estes pacientes. Assim, o tratamento da anemia vem sendo feito de maneira racional e sistemática, priorizando manter níveis adequados de Ht e Hb. Analisando-se os grupos pôde-se concluir que a anemia encontra-se bem controlada e estabilizada independente da via de administração do ferro.

Com este estudo descritivo pôde-se observar que a grande maioria dos pacientes foi responsiva ao tratamento com ferro oral, contrariando um grande número de pesquisas que apontam esta forma de tratamento como ineficaz para o paciente renal crônico em hemodiálise.

REFERÊNCIAS

- Romão Jr JE. Insuficiência renal crônica. In: Cruz J. Nefrologia. São Paulo: Sarvier; 1995. p. 187-200.
- Miller O, Gonçalves RR. Doenças dos rins e vias urinárias. In: Laboratório para o clínico. 8rd ed. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 519-32.
- Wilkins KG. Cuidado nutricional na doença renal. In: Mahan LK. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 9rd ed. São Paulo: Roca; 1998. p. 787-822.
- Riyuzo MC, Macedo CS, Assao AE, Fekete SMW, Trindade AAT. Insuficiência renal na criança. J Bras Nefrol 2003;25: 200-8.
- Feiman R, Castro EM, Paniagua GG. La anemia em la insuficiência renal crônica. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx 1981;38:231-41.
- Lee GR. As anemias normocíticas, normocrômicas. In: Wintrobe MM, et al. Hematologia Clínica. 1rd ed. São Paulo: Manole; 2004. p. 968-95.
- Lorenzi TF. Anemias. In: Manual de hematologia. 2rd ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2004. p. 217-326.

- Besarab A, Vlasses P, Caro J. Optimization of epoetin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol 2000; 11:530-8.
- Bolaños L. Contínuos intravenous sodium ferric gluconate improves efficacy in the maintenance phase of EPOrHu administration in hemodialysis patients. J Am Nephrol 2002;22:67-72.
- Baillie GR, Franco RJS, Mandal AK, Kirilin LF, Katz MA. Parenteral iron use in the management of anemia in end-stage renal disease patients. J Am Kidney Dis 2000; 35:1-12.
- Jungers P, Denker BM, Marx JJ. Beneficial influence of recombinant human erythropoetin therapy on the rate of progression of chronic renal failure in predialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2001;16:307-12.
- Deferrari R. Suplementação de ferro em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise: um ensaio clínico. Rev Hosp Clín Porto Alegre 2002; 20:202-12.
- Luvizzoto ML. Eficácia da eritropoetina administrada por via intravenosa em doses baixas na anemia associada à insuficiência renal crônica. Estudo de 20 pacientes em hemodiálise. J Bras Nefrol 1999;21:59-63.
- Morgan HEG, Gautam M, Geary DF. Maintenance intravenous iron therapy in pediatric hemodialysis patients. Pediatr Nephrol 2001;16:779-83.
- Feldman HL, Dacie JV, Clauss A. Administration of parenteral iron and mortality among hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol 2004;15:1623-32.
- Fishbane S, Mittal SK, Maesaka JK. Iron management in end-stage renal disease. Am J Kidney 1997;29:319-33.
- Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- Churchill DN. Clinical practice guidelines for initiation of dialysis. Am J Kidney Dis 2002; 39(2):376-82.
- Singh NP. Current recommendations on iron therapy in anaemia of chronic renal failure. JAPI 2002; 50:1295-302.
- Herruzo JAS. Actitud a seguir ante un estado de sobrecarga de hierro. Rev Esp Enferm Digest 2003;95(5):343-50.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Romélio Pinheiro Gonçalves.

Rua Pereira Valente 640 Apt° 701. Meireles.

CEP. 60160-250. Fortaleza-Ceará.

Tel. 0 xx (85) 32682205.

E-mail: romeliapinheiro@ig.com.br.



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Papiloma Vírus Humano (HPV)

Human Papillomavirus (HPV)

BRAGAGNOLO, A.L.¹; ELI, D.¹; HAAS, P.²

RESUMO - Está estabelecido que o HPV (Human Papillomavirus) é o causador de cerca de 99% dos casos de câncer de colo de útero e de uma fração variável de câncer de vagina, vulva, pênis e ânus. Este dado está relacionado a mais de 100 tipos de HPV existentes com diferentes seqüências de DNA. A incidência de casos de câncer de colo de útero atinge principalmente mulheres de 20 anos a 29 anos de idade, sendo que a morbidade nesta faixa etária pode ser diminuída com o rastreamento de lesões do colo de útero e células infectadas pelo HPV, bem como, com a imunização através da vacina bivalente ou quadrivalente. A vacinação preventiva deve ser dada antes da infecção pelo HPV, devido a seu efeito profilático, para que o sistema imune reconheça e evite a infecção viral antes da entrada do vírus na célula. Conseqüentemente, as lesões de colo de útero classificadas como NIC II, NIC III e câncer de colo de útero serão impedidas de instalar-se. Existem duas vacinas desenvolvidas atualmente, a Gardasil® - Merck (quadrivalente) e a Cervarix® - GlaxoSmithKline (bivalente), sendo que ambas utilizam partículas de L1 viral específicas contra o genótipo do HPV, evitando o desenvolvimento de infecção. Estima-se que a eficácia seja de até 5 anos, os quais ainda estão em curso para comprovação. A vacina deverá ser incorporada ao novo calendário brasileiro de imunização, sendo obrigatório para pessoas com doze anos ou mais, assim que sua eficácia e o custo benefício forem comprovados. Desta forma, pretende-se diminuir a estimativa de câncer de colo de útero, infecções genitais e esterilidade decorrente destas doenças. Entretanto, o preventivo da citologia cervico-vaginal continua sendo necessário para a triagem e diagnóstico de possíveis lesões decorrentes de outros motivos que não o HPV.

PALAVRAS-CHAVE - HPV, câncer de colo de útero, vacina.

SUMMARY - It is known that HPV (Human Papillomavirus) is the cause of about 99% of cervical cancer cases of a variable fraction of vagina, vulva and penis and anus cancer. This data is related to more than a 100 types of existing HPV with different sequences of DNA. The incidence of cervical cancer affects mainly women who become sexually active in their 20s to their 30s and the morbidity in this age group can be reduced by tracking the injury in the uterus and cervix cells infected by HPV and the immunization through bivalent vaccine or quadrivalent. The vaccination should be given before HPV infection, because of its prophylactic effect, so that the immune system recognizes it and avoids a viral infection before the entry of the virus in the cell. Consequently the lesions of the cervical are classified as CIN II, CIN III and cervical cancer and genital warts will be prevented from installing themselves. There are two vaccines developed now, the Gardasil® - Merck and Cervarix® - GlaxoSmithKline, both use L1 viral particles directed against HPV genotype, avoiding the infection development. It is estimated that the efficiency is up to 5 years, which are still underway. The vaccine should be incorporated into the new Brazilian immunization calendar, and being obliged for people with twelve years or more, so their efficiency and cost benefits are proven. Thus, it is intended to reduce the estimate of cervical cancer, genital infections and sterility caused by such diseases. However the prevention of cervical - vaginal cytology remains necessary for the triage and diagnosis of possible injuries resulting from other reasons than HPV.

KEYWORDS - HPV, cervical cancer, vaccine.

INTRODUÇÃO

Um dos descobrimentos mais importantes da investigação etiológica do câncer nos últimos 25 anos é a relação causal entre a infecção pelo vírus de papiloma humano (HPV) e o câncer de colo de útero (1). Atualmente, está amplamente estabelecido que o HPV seja o causador de cerca de 99% dos casos de câncer de colo de útero e de uma fração variável de câncer de vagina, vulva, pênis e ânus (20). Outros fatores que contribuem para a etiologia deste tumor são o tabagismo, baixa ingestão de vitaminas, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce e uso de contraceptivos orais (4).

Estimativas indicam que infecções por algum tipo de HPV ocorrem em até 75% das pessoas com vida sexual ativa. Atualmente, existem mais de 100 tipos de HPV identificados, com diferentes seqüências de DNA, e 30 destes já foram encontrados em infecções da mucosa anogenital (1). São divididos em baixo-risco (HPVs tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e CP6108), encontrados geralmente em pacientes com verrugas genitais, e de alto-risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82), sendo os tipos HPV 16 e 18, relacionados com aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical invasivo e mais de 90% das lesões intra-epiteliais graves (8; 22; 27).

Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo

(29), o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano. Mais de 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, onde a população não tem acesso fácil ao exame do preventivo do câncer de colo de útero e nem a tratamento adequado (12).

A incidência por câncer do colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 anos a 29 anos de idade e o risco aumenta na faixa etária de 45 anos a 49 anos de idade. Em países desenvolvidos, a sobrevida média em cinco anos varia de 59% a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de aproximadamente 49% após cinco anos. A média mundial estimada também é de 49%. O número de novos casos de câncer de colo de útero estimados para o Brasil em 2008 foi de 18.680 casos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Na região sul do Brasil, estima-se 24 casos em 100 mil mulheres (22).

O diagnóstico do câncer de colo uterino tem, nos últimos 50 anos, agregado ferramentas para a prevenção deste tipo de câncer, incluindo métodos de baixa tecnologia como o exame visual com ácido acético e o ácido acético amplificado, além de intervenções mais desenvolvidas. Estudos têm demonstrado importantes avanços alternativos à técnica do Papanicolau convencional, como a citologia de base

Recebido em 12/11/2008

Aprovado em 07/01/2010

¹Acadêmicas do curso de Farmácia - Análises Clínicas - UFSC

²Profa. Departamento de Análises Clínicas (ACL), UFSC

líquida e biomarcadores, bem como novas e potentes técnicas diagnósticas (provas de detecção genérica ou específica do HPV) (7). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o exame de colo de útero (Papanicolau) a cada três anos para todas as mulheres entre 25 anos e 59 anos de idade que apresentaram citologia normal no último exame (5).

É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por este câncer pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 anos a 65 anos de idade com o teste de Papanicolau e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ* (20).

A vacinação é historicamente o método mais barato e efetivo de se combater uma doença infecciosa (32) e a incorporação da vacina contra o HPV pode se constituir no futuro, uma importante ferramenta no controle do câncer de colo do útero (4).

Duas vacinas contra o HPV estão disponíveis comercialmente: a bivalente Cervarix® (GlaxoSmithKline) e a quadrivalente Gardasil® (Merck). Ambas objetivam prevenir o HPV tipo 16 e 18 que, mundialmente, são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical, 50% das lesões pré-cancerosas de alto risco e 25% das lesões de baixo risco. A vacina quadrivalente também previne contra os tipos 6 e 11, os quais estão associados à verrugas na região genital e lesões cervicais de baixo risco. A vacina bivalente está indicada para mulheres entre 10 anos e 45 anos de idade enquanto a quadrivalente foi autorizada para mulheres entre 9 anos e 25 anos de idade e meninos entre 10 anos e 15 anos de idade (8). No Brasil, foi autorizado em 2006, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, a comercialização da vacina quadrivalente.

O diagnóstico do HPV é basicamente clínico e pode ser confirmado por biópsia e através de citopatologia. O diagnóstico definitivo é feito pela presença do DNA viral por meio de testes de hibridização molecular (hibridização *in situ*, reação em cadeia de polimerase [PCR] e captura híbrida). Relativamente à identificação dos vários tipos de HPV ainda não está claro seu valor na prática clínica e as decisões quanto às condutas clínicas não devem ser feitas com base nesses testes (9).

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão sistemática de artigos que abordam o HPV (human papillomavirus), verificando as seguintes variáveis: características e a transmissão do HPV; patologia e epidemiologia do vírus; vacinas para a prevenção do HPV e novas perspectivas de prevenção da infecção.

METODOLOGIA

A metodologia utilizada no presente trabalho, para a pesquisa de artigos, seguiu critérios de inclusão restritos como: vírus HPV, vacinas comercialmente disponíveis, vacinas terapêuticas e dados epidemiológicos no período de 2003 a 2008 em todos os idiomas. As bases de dados utilizadas foram PubMed (Medline) e Bireme. Os dados epidemiológicos foram baseados em publicações do IARC e INCA.

Biologia do HPV (*human papillomavirus*)

Papiloma vírus são vírus de DNA espécie - específicos. Muitos mamíferos diferentes abrigam este vírus que infecta as células do epitélio basal (pele e mucosas). Eles também são local-específico dentro do epitélio de um determinado organismo, significando que alguns tipos causam apenas verrugas cutâneas em humanos e outros causam doenças, especificamente na região anogenital (1).

O genoma do HPV foi seqüenciado e consiste de aproximadamente 8.000 pares de base circulares de DNA, com 8 *open reading frames (ORFs)* que codifica proteínas estruturais necessárias à replicação e ao revestimento viral. A expressão destes ORFs é controlada por uma região longa de controle (RLC) não-codificadora que contém fatores de transcrição locais que originam a replicação viral (6). Essas proteínas são divididas em duas classes: *early proteins* e *late proteins*. As *early proteins* regulam a replicação do DNA virótico (E1 e E2), a transcrição do RNA virótico (E2), a reorganização do citoesqueleto (E4) e a transformação da célula (E5, E6 e E7). As *late proteins* (L1 e L2) são componentes estruturais do capsídeo virótico (16). Cinco proteínas L1 juntas formam um pentâmero, sendo que, 72 destes pentâmeros se tornam a partícula viral (responsável pela resposta humoral e formação de anticorpo) (11). A expressão destas duas classes de proteínas é altamente regulada e estão associadas à diferenciação de células epiteliais infectadas pelo HPV (16).

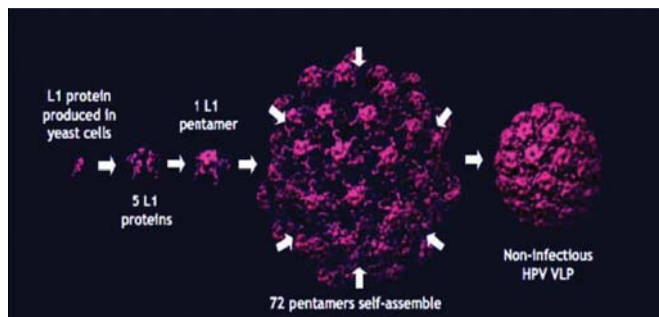


Fig. 1 Seqüência, em formação, da partícula viral utilizada na vacina quadrivalente

Fonte: HENDRIX, 2008.

A proteína E2 tem uma importante função na replicação viral e regulação da expressão gênica do HPV. Esta proteína liga-se a quatro sítios da RCL do HPV e, pela interação proteína-proteína, aumenta a ligação com a E1, iniciando a replicação viral. Em células infectadas pelo HPV, supõe-se que a ligação entre RCL e E2 reprima a expressão gênica do vírus e desta forma contribui para o controle de proliferação da célula pela regulação da expressão de E6 e E7. No entanto, em carcinomas cervicais, o genoma do HPV frequentemente é integrado ao genoma da célula hospedeira, o que leva à diminuição da expressão de E2. Isto conduz a altos níveis de E6 e E7 e, conseqüentemente, a uma proliferação celular aumentada (6). Além disso, estudos demonstraram que a proteína E2 do HPV 16, independente de E6 e E7, é capaz de provocar apoptose em células infectadas (30) e, também interagir diretamente com p53 (18). No estudo de Brown e colaboradores, em 2008, observa-se a comprovação da interação de p53 com E2, inibindo a replicação do HPV 16 e, também, a modulação da atividade de transcrição desta proteína.

Os cânceres cervicais estão principalmente, associados aos subtipos de alto risco (por exemplo os tipos 16 e 18) que expressam as oncoproteínas E6 e E7, que atuam na indução e manutenção do fenótipo transformado, regulando o ciclo de vida viral na célula. Estas oncoproteínas associam-se com fatores supressores de tumor; E6 associa-se a níveis celulares de p53 e E7 relaciona-se com a proteína retinoblastoma (pRb), também supressora de tumor (6; 14). A proteína E6 de HPV de alto risco liga-se à p53 que é, então, degradada por ação do proteossoma. Com a função de p53 diminuída, ocorre descontrole do ciclo celular (aumentan-

do a proliferação), diminuição da apoptose e do reparo no DNA. Este defeito pode servir de força motriz para a progressão de uma displasia ou câncer. A oncoproteína E7, entre muitas outras funções, liga-se à pRb e aumenta a proliferação celular desfazendo o complexo pRb-E2F e a segmentação pRB para a degradação do proteossoma. Com isso, também, ocorre perda do controle do ciclo celular. A perda combinada de p53 e da função de Rb parece agir sinergicamente para a formação de um processo maligno (1; 6). Estudos recentes, como de Mellone e colaboradores, confirmam a atuação destas oncoproteínas na diminuição da função de p53 e pRb. Há pesquisas que também demonstram a variabilidade genética entre E6 e E7, onde E6 mostra-se mais variável enquanto E7 mais conservado geneticamente (24).

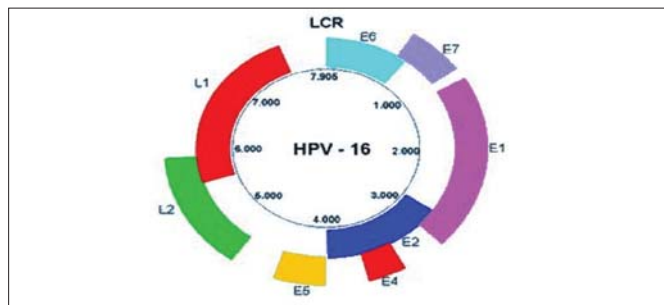


Fig. 2 Esquema da região longa de controle (RLC): early proteins (E1 – E7) e late proteins (L1 e L2).
Fonte: MS, 2008.

A aquisição do HPV no trato genital ocorre rapidamente após o ato sexual e, na maioria das infecções, incluindo os tipos de alto risco, não leva à displasia. A cura espontânea pode ocorrer dentro de 2 anos, não sendo detectado nenhum resíduo de DNA do vírus. As mulheres que desenvolvem lesões cervicais, citologicamente ou histologicamente detectáveis, em resposta a infecções pelo HPV, terão uma efetiva resposta imune mediada por células com consequente regressão da lesão. Em uma pequena proporção de mulheres, a infecção persistente continua podendo levar ao desenvolvimento de lesões cervicais de alto-grau e câncer cervical. Uma resposta imune sistêmica considerável, com neutralização de anticorpos anti HPV tipo-específico, acontece em apenas 50% a 60% das mulheres infectadas. Esta resposta é considerada fraca e lenta, ocorrendo vários meses após a infecção inicial. Estudos da história natural da doença provêm evidências contraditórias para a proteção por anticorpos naturalmente adquiridos contra reinfecção com o mesmo genótipo, embora exista evidência de proteção a nível celular, do qual pode ser até mesmo pertinente na ausência de anticorpos. Em alguns indivíduos, o vírus pode permanecer durante muitos anos em estado inativado, nas células do epitélio basal, mas pode ser reativado com supressão da imunidade (26).

Vacina do HPV

A descoberta de que as verrugas genitais e o câncer cervical estão relacionados com a etiologia do HPV levou ao desenvolvimento de vacinas que podem prevenir o câncer de colo do útero. A vacinação preventiva deve ser dada antes da infecção pelo HPV, a fim de ajudar o sistema imune a reconhecer e evitar a infecção viral antes da entrada do vírus na célula, ou antes que a doença se estabeleça. O conhecimento da biologia viral é essencial para o desenvolvimento destas vacinas que contêm o vírus atenuado,

gerando anticorpos neutralizantes dirigidos às proteínas L1 e L2 do capsídeo, a qual tem papel importante na entrada do vírus na célula (29;16).

Estas vacinas, que tem efeito profilático sobre o HPV, são constituídas pelo vírus recombinante monoinfecioso, como a partícula L1 do capsídeo, induzindo à ativação do sistema imune pela fagocitose das partículas e formação de anticorpo contra o tipo específico de partícula do capsídeo viral recombinante. Logo, a vacina bivalente induz à formação de anticorpo contra HPV 16 e 18 (responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical), enquanto que a quadrivalente leva à produção de anticorpo anti- HPV 6, 11, 16 e 18 (responsáveis por 90% dos casos de câncer cervical). Desta forma, supõe-se que a vacina quadrivalente evite lesões de colo de útero classificadas como NIC II, NIC III, câncer de colo de útero e verrugas genitais, sendo que este último não é evitado pela vacina bivalente (19). Em estudo recente, Hildesheim e colaboradores, avaliaram a eficácia terapêutica da vacina contendo partículas virais contra HPV 16 e 18 (Cervarix®) em mulheres com lesões pré-cancerosas causadas HPV 16 e/ou 18. Essas mulheres foram avaliadas por um período de 12 meses e ficou demonstrado que a vacina não acelera a liberação viral e não deveria ser usada com propósito de tratar infecções.

As proteínas L1 e L2 não são expressas no interior da célula basal infectadas pelo HPV, diferentemente das proteínas E6 e E7 que são expressas, nas infecções viróticas, em todos os níveis do epitélio infetado. Desta maneira, vacinas contendo proteínas E6 e E7 auxiliam também na progressão da doença, gerando células T mediando à resposta imune contra estas proteínas. Existem vários estudos visando o desenvolvimento da vacina terapêutica tendo como alvo as proteínas E6 e E7, já com testes pré-clínicos e clínicos como as vacinas utilizando peptídeos ou base protéica, vacinas com vetor atenuado, vacinas de base celular e vacinas de DNA. Entre as diferentes formas de vacina terapêutica contra o HPV, as que utilizam DNA tornaram-se atrativas e potencialmente efetivas para imunoterapias antígeno-específicas. A molécula de DNA é relativamente segura, estável e de fácil produção, podendo ser usada para sustentar níveis altos da expressão de antígenos em células. Além disso, desde que a vacina de DNA não estimule anticorpos contra o próprio DNA do paciente, ela poderá ser continuamente administrada. Vacinas de DNA, no entanto, são pouco imunogênicas em função da especificidade celular (DNA), além de ter habilidade intrínseca para amplificar ou espalhar-se ao redor das células in vivo. O potencial destas vacinas pode ser melhorado pela segmentação do DNA ou pela codificação de antígenos e, também, pela modificação da propriedade na expressão antigênica, tendo em vista impulsionar a resposta imune provocada pela vacina (16).

As duas vacinas desenvolvidas recentemente (Gardasil® – Merck e Cervarix® – GlaxoSmithKline) utilizam partículas de L1 viral específicas contra o genótipo do HPV, evitando o desenvolvimento de infecção. Gardasil®, vacina profilática quadrivalente, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2006, foi avaliada em estudo prospectivo de fase II e III, randomizado, *double-blind*, com placebo como controle, com 20.541 mulheres entre 15 anos e 26 anos de idade, em 13 países (15; 3). Esta vacina contém partículas virais inativadas do HPV tipo 6, 11, 16 e 18 e hidróxido de alumínio como adjuvante, com a função de impulsionar a resposta imune. Para a produção da vacina foi utilizado tecnologia de DNA recombinante para produção das partículas virais L1 em levedo de *Saccharomyces*

cerevisiae (23; 29). As mulheres avaliadas, que atendiam as exigências de não estarem grávidas, não apresentarem histórico de exame Papanicolaou com anormalidades, apresentarem não mais que 4 parceiros sexuais, receberam a vacina Gardasil® ou placebo, que foram administradas em 3 doses, em intervalos de 0, 2 e 6 meses. O resultado primário mostrou a incidência de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau II ou III, adenocarcinoma *in situ*, ou carcinoma cervical invasivo relacionados com HPV 16 e 18. Resultados secundários incluíam a incidência de cada tipo de lesão individualmente e lesões que continham HPV, indiferente do tipo (HPV 16 e/ou HPV 18). Os resultados foram avaliados em mulheres suscetíveis ao HPV 16 e 18 (por exemplo, mulheres não infectadas pelo HPV 16 ou 18 por 1 mês após a última dose), que receberam 3 doses da vacina (pelo protocolo da população susceptível). Também, em mulheres suscetíveis ao HPV tipo 16 e 18 e que receberam ao menos 1 dose da vacina (população susceptível irrestrita) e em mulheres que apesar de infectadas pelo HPV ou do estado da neoplasia cervical, no começo do estudo aderiram ao protocolo de estudo (população com intenção de tratamento). As mulheres foram acompanhadas com exame ginecológico no primeiro e sexto mês após a última injeção e após 24, 36 e 48 meses. Mulheres com mais de uma lesão histológica foram consideradas apenas na primeira avaliação, como eram as mulheres com ambos os tipos de HPV, ou seja, tipos 16 e 18. Os resultados foram apresentados como taxa de eficácia da vacina, correspondente a redução do risco relativo (3; 15).

Esses resultados foram apresentados após 3 anos de acompanhamento. A idade média das mulheres acompanhadas foi de 20 anos e a maioria tinha vida sexual ativa. No protocolo da população susceptível, houve 98% de eficácia das mulheres que utilizaram a vacina quando comparadas as que utilizaram placebo. A eficácia da vacina na população susceptível, que não seguiu o protocolo (população susceptível irrestrita), foi de 95%. A eficácia para ambas as populações suscetíveis foi de 100% para adenocarcinoma *in situ*. Um percentual de 98% de todas as mulheres analisadas recebeu ao menos uma vacina e uma visita ao médico. As mulheres infectadas na cérvix (antes da administração da vacina) pelo HPV 16 (9%) e as mulheres infectadas pelo tipo 18 (4%), tiveram anormalidades citológicas, mesmo tendo utilizado a vacina, ficando assim demonstrado que a vacina não alterou o curso das lesões. A vacina também não foi eficaz para proteger contra NIC III ou adenocarcinoma *in situ* quando considerados todos os tipos de HPV (HPV tipo diferente de 16 e 18). Em um subgrupo imunogênico, a soropositividade inicial era maior que 99% para todos os tipos de vacina; porém, após 24 meses mais de 90% das mulheres eram soropositivas para HPV tipo 6, 11 e 16 e 68% eram soropositivas para HPV 18. Efeitos adversos eram semelhantes dentre ambos os grupos; porém, no grupo de mulheres que engravidou e que a data de concepção calculada estaria dentro de 30 dias da data última injeção, havia, estatisticamente, aumento significativo do risco absoluto (5 no grupo da vacina e zero no grupo placebo) de crianças nascerem com alguma anomalia congênita (15).

Em 2006, Villa e colaboradores, publicaram dados sobre a eficácia da vacina quadrivalente a partir da segunda fase de avaliação dos 5 anos em curso. Neste estudo, 552 mulheres foram incluídas nos primeiros 3 anos, sendo que um grupo de 241 foi cadastrado no início e, até os 2 anos seguintes, foram incluídos mais 226 mulheres. Nesta amostragem foi verificado que a vacina reduziu a incidência da infecção pelo HPV 6, 11, 16, e 18 em 96% (houveram 2 infectados no grupo vaci-

nado e 46 no grupo controle), NIC e verrugas genitais foram prevenidas em 100% nas mulheres vacinas (28).

Durante a terceira fase do estudo da vacina quadrivalente está sendo avaliada a eficácia em homens, para que toda a população seja imunizada. Dados mais aprofundados, no entanto, poderão ser conhecidos em aproximadamente um ano (11). Em estudo, também, está o tempo de eficácia da vacina que atualmente é estimado em cinco anos (3).

A vacina bivalente Cervarix®, aprovada na Austrália, para meninas e mulheres entre 10 anos e 45 anos de idade e que atualmente aguarda aprovação do FDA, constitui-se também de partícula viral inativada L1, eficaz contra HPV tipo 16 e 18, e utiliza como adjuvante, para impulsionar a resposta imune, um sal de alumínio adicionado de um monofosfolípido (produzido pelo laboratório GlaxoSmithKline). A vacina é produzida utilizando células de inseto infectadas com *baculovirus* e é administrada em três doses (0, 1 e 6 meses). A fase III desta vacina foi testada com 18.644 mulheres entre 15 anos e 25 anos de idade, onde 9.258 recebem a vacina. Na análise primária, estudaram-se mulheres que não apresentavam o vírus HPV e lesões NIC II eram utilizadas como *endpoints* primários. A eficácia da vacina foi de 90,4% para HPV tipo 16 e 18 associados a lesões NIC II, com 93% de eficácia para HPV tipo 16 e 83% para o tipo 18. Uma análise adicional realizada com 23 mulheres com NIC II mostrou que 14 destas apresentavam outros tipos de HPV nas lesões. Em 3 destes casos, a causa da lesão não era o tipo 16, nem o tipo 18. Desta forma pode-se ter uma eficácia de 100%. Para lesões NIC I, a eficácia da vacina bivalente foi de 89%. Assim como a vacina quadrivalente, Cervarix® apresentou reação cruzada contra outros tipos de HPV, como, por exemplo, HPV tipo 45 com 60% e tipo 31 com 36% (3; 29).

Um pré-requisito para a geração de vacinas que impede a infecção por um amplo espectro de tipos de HPV é o de conhecimentos do vírus para a obtenção de determinantes comuns e específicos de cada tipo de resposta imune (25). A vacina contendo partículas virais (*virus-like particles* - VLPs) é estruturalmente e imunologicamente semelhante ao vírus do HPV, como determinado por microscopia eletrônica que tem habilidade em vincular a conformação dependente de anticorpos monoclonais (mAbs) (17). Níveis altos de anticorpos neutralizantes, altamente específicos contra a proteína L1 de cada tipo de HPV, podem ser gerados após a imunização por VLPs. A análise dos diversos tipos de HPV mostra um elevado grau de homologia entre as proteínas L1 de diferentes *papillomavirus*; no entanto, apesar desta semelhança, está bem documentado em estudos de infecções genitais pelo HPV a presença de anticorpo específico para cada tipo viral. Tanto a *linears* como a conformação do epítipo foram identificadas na superfície da VLP L1 do HPV e desta forma, fica bem estabelecido que a conformação do epítipo seja a responsável pela atividade neutralizante do anticorpo (31).

Estudos mostraram que a vacina contendo VLP L1 aumenta a proliferação de células T e a produção de citocinas. A resposta mediada por citocinas mostra-se importante tanto na indução quanto na manutenção da resposta humoral, enquanto que os linfócitos T citotóxicos são responsáveis pela regressão do tumor (10).

As proteínas virais E6 e E7 são antígenos tumorais específicos que atuam nas células hospedeiras. Essas proteínas são o alvo da imunoterapia, que atua através da indução da proliferação de células T de memória (linfócitos CD8) que reconhecem o antígeno protéico através do seu receptor, liberando substâncias que criam um poro na membrana

que lisa a célula hospedeira. Esta célula libera mediadores que irão induzir a apoptose (33). Vacinas contendo E6 e E7, no entanto, ainda estão em fase de estudos. No Brasil, a vacina deverá ser incorporada ao novo calendário anual de imunização, sendo obrigatório para pessoas com doze anos ou mais. Entretanto, o tratamento completo apresenta um custo considerado elevado, fator este que implica em um processo de negociação com o laboratório a fim de diminuir o valor do investimento e conscientizar a população sobre a necessidade e os benefícios da vacina, e assim viabilizar a incorporação ao SUS (4).

CONCLUSÃO

As vacinas disponíveis comercialmente, bivalente e quadrivalente são segundo estudos já publicados e em andamento, eficazes quando se trata de HPV 16 e 18, reduzindo assim, a incidência lesões de alto risco de colo de útero e até mesmo o câncer cervical.

A vacina quadrivalente protege ainda contra o HPV tipo 6 e 11 causadores de verrugas genitais. Pretende-se ainda a realização da vacinação em homens, objetivando protegê-los e também evitar a disseminação do vírus. Apesar da comprovada eficácia da vacina entre as mulheres, ainda há pouca adesão devido ao seu alto custo.

Atualmente, no Brasil, o Sistema Único de Saúde disponibiliza como forma de prevenção contra o HPV, o exame de triagem como o citopatológico do câncer de colo de útero (Papanicolau), para detectar lesões no colo uterino. Estima-se que em breve esteja disponível a vacina terapêutica (a partir das oncoproteínas E6 e E7) para as pessoas que já tiveram contato com o HPV e adquiriram algum tipo de lesão e preventiva para indivíduos ainda não expostos ao vírus.

Com a inclusão da vacina no calendário imunológico, disponibilizada pelo SUS, tenderá a uma adesão efetiva a imunização com conseqüente menor incidência de lesões de colo de útero e de vagina. Assim, a longo prazo, será possível obter gastos menores com tratamento curativo e com subsídio a pacientes acometidas durante a idade produtiva. Com isso, a diferença entre tratamento profilático e curativo será positiva para o SUS.

REFERÊNCIAS

- BERRY, J. M. & PALEFSKY, J. M. - A review of human papillomavirus vaccines: from basics science to clinical trials. *Frontiers in Bioscience*, 8: 333-345, 2003.
- BOSCH, F.X; LORINCZ, A; MUNÓZ, N; MEIJER, C.J.L.M; SHAH, K.V. - The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathology*, 55: 244 - 265, 2002.
- BRAATEN, K. P. & LAUFER, M.R. - Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev. in Obstetrics & Gynecology*, 1 (1): 2-10, 2008.
- BRASIL. Inca (Org.). Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 18 jul. 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde (Org.). Mapa da Saúde do Brasileiro. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=44917>. Acesso em: 18 jul. 2008.
- BROWN, C; KOWALCZYK, A.M; TAYLOR, E.R; MORGAN, I.M; GASTÓN, K. - p53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *J. Virology*, 5 (5): 1 - 9, 2008.
- CASTELLSAGUÉ, X. & BOSCH, F.X. - Avances en la prevención del cáncer de cuello de útero: vacunas VPH. *Farmacia Hospitalaria*, 31: 261 - 263, 2007.
- CUTTS, F.T; FRANCESCHI, S; GOLDIE, S; CASTELLSAGUÉ, X; DE SANJOSE, S; GARNETT, G; EDMUNDS, W.J; CLAEYS, P; GOLDENTHAL, K.L; HARPER, D.M; MARKOWITZ, L. - Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull. of the World Health Organization*, 85 (9): 719 - 726, 2007.
- DIÓGENES, M. A. R.; VARELA, Z. M. V. & BARROSO, G.T. - Papillomavirus humano: repercussão na saúde da mulher no contexto familiar. *Revista Gaúcha Enfermagem*, 27 (2): 266 - 273, 2006.
- GARCÍA-PIÑERES, A; HILDESHEIM, A.; DODD, L; KEMP, T.J; WILLIAMS, M; HARRO, C; LOWY, D.R; SCHILLER, J.T; PINTO, L.A. - Cytokine and Chemokine Profiles following Vaccination with Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14 (8): 984 - 989, 2007.
- HENDRIX, S. L. - Assessing Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Safety. *J. American Osteopathic Association*, 108 (2): 8 - 12, 2008.
- HERBERT, J. & COFFIN, J. - Reducing Patient Risk for Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *J. American Osteopathic Association*, 108 (2): 65-70, 2008.
- HILDESHEIM, A; HERRERO, R; WACHOLDER, S; RODRIGUEZ, A.C; SOLOMON, D; BRATTI, M.C; SCHILLER, J.T G.ONZALEZ, P; DUBIN, G; PORRAS, C; JIMENEZ, S.E; LOWY, D.R. - Effect of Human Papillomavirus 16/18 L1 Viruslike Particle Vaccine Among Young Women With Preexisting Infection: A Randomized Trial. *J. American Medical Association*, 298 (7): 743 - 753, 2007.
- HOSTETLER, K.Y; ROUGHT, S; ALDERN, K.A; TRAHAN, J; BEADLE, J.R; CORBEIL, J. - Enhanced antiproliferative effects of alkoxyalkyl esters of cidofovir in human cervical cancer cells in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (1): 156 - 159, 2006.
- HOWARD, M. & LYTWYN, A. - The HPV vaccine: An analysis of the FUTURE II study. *Canadian Family Physician*, 57: 2157 - 2159, 2007.
- HOSTETLER, K.Y; ROUGHT, S; ALDERN, K.A; TRAHAN, J; BEADLE, J.R; CORBEIL, J. - DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Experimental and molecular medicine*. 39 (6): 679-689, 2007.
- KIRNBAUER, R; BOOY, F; CHENG, N; LOWY, D.R; SCHILLER, J.T. - Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Nacional Acad. Science USA*, 89 (24): 12180-12184, 1992.
- MASSIMI, P; PIM, D; BERTOLI, C; BOUVARD, V; BANKS, L. - Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene*. 18: 7748-7754, 1999.
- MCINTOSH, J; STURPE, D.A; KHANNA, N.- Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists. *J American Pharmacists Association*, 48: 1 - 17, 2008.
- MELLONE M, RINALDI C, MASSIMI I, PETRONI M, VESCHI V, TALORA C, TRUFFA S, STABILE H, FRATI L, SCREPANTI I, GULINO A, GIANNINI G. - Human Papilloma Virus-Dependent HMGA1 Expression Is a Relevant Step in Cervical Carcinogenesis. *Neoplasia*, 10 (8):773-781, 2008.
- MUÑOZ, N; CASTELLSAGUÉ, X; DE GONZÁLEZ, A.B; GISSMANN, L. - HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 (3): 1 - 10, 2006.
- NORONHA, C. P.; FERREIRA, J. M. O.; OLIVEIRA, J. F. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, M. O.; REBELO, M. S.; REIS, R. S.; LIMA, R. J. C. - Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2007, 96 P.
- OGUNMODEDE, F; YALE, S.H; KRAWISZ, B; TYLER, G.C; EVANS, A.C. - Human Papillomavirus Infections in Primary Care. *Clinical Medicine & Research*, 5(4): 210 - 217, 2007.
- PANDE, S; JAIN, N; PRUSTY, B.K; BHAMBHANI, S; GUPTA, S; SHARMA, R; BATRA, S; DAS, B.C. - Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India. *J. Clinical Microbiology*, 46 (3): 1060 - 1066, 2008.
- ROTH, S.D; SAPP, M; STREECK, R.E; SELINKA, H.C. - Characterization of neutralizing epitopes within the major capsid protein of human papillomavirus type 33. *J. Virology* 83 (3): 1 - 11, 2006.
- SKINNER, S.R.; GARLAND, S.M; STANLEY, M.A; PITTS, M; QUINN, M.A. - Human papillomavirus vaccination for the prevention of cervical neoplasia: is it appropriate to vaccinate women older than 26?. *Medical J. Australian*, 188 (4): 238 - 242, 2008.
- VILLA, L. L. - Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pública de México*, 45 (3): 443 - 448, 2003.

28. VILLA, L.; COSTA, R.L.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; AUL, K.A.; GIULIANO, A.R.; WHEELER, C.M.; KOUTSKY, L.A.; MALM, C.; LEHTINEN, M.; SKJELDESTAD, F.E.; OLSSON, S.E.; STEINWALL, M.; BROWN, D.R.; KURMAN, R.J.; RONNETT, B.M.; STOLER, M.H.; FERENCZY, A.; HARPER, D.M.; TAMMS, G.M. YU J; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F.J; JANSEN, K.U.; ESSER, M.T; SINGS, H.L.; SAAH, A.J; BARR, E. - Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncology*, 6: 271-278, 2005.
29. WANG, K. L. - Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwan J. Obstetric Gynecology*, 46 (4): 352 - 362, 2007.
30. WEBSTER, K; PARISH, J; PANDYA, M; STERN, P.L; CLARKE, A.R; GASTON, K. - The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 Protein Induces Apoptosis in the Absence of Other HPV Proteins and via a p53-dependent Pathway. *J. Biological Chemistry*, 275 (1): 87 - 94, 2000.
31. WHITE, W.I.; WILSON, S.D; PALMER-HILL, F.J; WOODS, R.M; GHIM, S.J;

- HEWITT, L.A; GOLDMAN, D.M; BURKE, S.J; JENSON, A.B; KOENIG, S; SUZICH, J.A. - Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human Papillomavirus Type 16 L1. *J. Virology*, 73 (6): 4882 - 4889, 1999.
32. WINTERS, U; RODEN, R; KITCHENER, H; STERN, P. - Progress in the development of a cervical cancer vaccine. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2(3): 259 - 269, 2006.
33. YAN, J. HARRIS, K; KHAN, A.S; DRAGHIA-AKLI, R; SEWELL, D; WEINER, D.B. - Cellular immunity induced by an ovel HPV 18 DNA vaccine encoding E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques. *Journal Vaccine*. 26 (40): 5210-5215, 2008.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Patrícia Haas
Rua Fernando Ferreira de Mello, 172/501-B
CEP. 88085-260 Florianópolis - SC



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!

Estudo comparativo entre a prova da fosfatase alcalina e a análise microbiológica de leite humano processado em banco de leite do Recife – PE

Comparative study between the test of the alkaline fosfatase and the microbiological analysis of human milk processed at milk bank of Recife - PE

Elma Freitas do Nascimento¹ & Maria do Rosário de Fátima Padilha²

RESUMO - O leite materno pasteurizado nos Bancos de Leite Humano passa pelo controle de qualidade microbiológico, a fim de disponibilizar um leite isento de contaminação. Outro método é a prova da Fosfatase Alcalina: enzima totalmente inativada durante a pasteurização. Na escolha de um novo método, algumas considerações devem ser seguidas, como: condições ideais de análise, custo, tempo de análise e complexidade do método. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo comparar a eficiência da análise da Fosfatase Alcalina com a microbiológica para, avaliar a qualidade do leite materno pasteurizado no Banco de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães. Setenta e cinco amostras foram coletadas em vidros estéreis, sendo realizados ensaios em triplicata, atingindo um total de 225 análises: 25 amostras de leite cru para controle do teste da Fosfatase Alcalina; e 50 amostras de leite pasteurizado, sendo metade empregada para cultura microbiológica e metade para análise de detecção da Fosfatase Alcalina em leite. Os resultados evidenciaram, em ambas as análises, pasteurização adequada. No entanto, a análise da FA, mostrou ser um método simples, prático, rápido e de menor custo quando comparado à análise microbiológica, o que facilita sua adoção pelos Bancos de Leite Humano.

PALAVRAS-CHAVE - Banco de Leite, Pasteurização, Fosfatase Alcalina, Leite Humano.

SUMMARY - The pasteurized mother milk in the Human Milk Banks passes for the microbiological quality control, in order to dispose a milk exempt of contamination. Another method is the test of the Alkaline Fosfatase: enzyme totality inactivated during the pasteurization. In the choice of a method some considerations must be followed, as: ideal conditions of analysis, cost, time of analysis and complexity of the method. Being thus, this work had for objective to compare the efficiency of the analysis of the Alkaline Fosfatase with the microbiological one to evaluate the quality of pasteurized mother milk in the Human Milk Bank of the Hospital Agamenon Magalhães. Seventy and five samples had been collected in barren glasses, being realized assays in third copy, reaching a total of 225 analyses: 25 of raw milk for control of the test of the Alkaline Fosfatase; and 50 of pasteurized milk, being half for microbiological culture and half for analysis with piece for detention of Alkaline Fosfatase in milk. The results evidenced in both analyses adequate pasteurization. However, the analysis of the FA showed to be a simple method, practical, fast e of lesser cost when compared with the microbiological analysis, what it facilitates its adoption for the Human Milk Banks.

KEYWORDS - Milk bank, Pasteurização, Alkaline Fosfatase, Human Milk.

INTRODUÇÃO

Amamentação, além de aumentar o vínculo afetivo mãe-filho, evita a contaminação do leite materno, pois o produto vai direto da fonte, o peito, ao consumidor, o bebê¹⁷. No entanto, alguns recém-nascidos, geralmente prematuros e/ou baixo peso, podem estar impossibilitados clinicamente de mamar; então, se faz necessária à ordenha deste leite. Para oferecer uma melhor qualidade do leite ordenhado oferecido a estes bebês foram criados os Bancos de Leite Humanos – BLH¹².

A Rede Nacional de Banco de Leite Humano – REDE BLH¹² - define BLH como “responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle da qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição”. Hoje, o Brasil comporta 175 Bancos de Leite Humano, sendo 34 destes localizados no Nordeste, dos quais apenas 9 estão em Pernambuco, que compreende: Hospital Agamenon Magalhães (HAM), Hospital Barão de Lucena (HBL), Hospital de Ávila, Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC), Hospital Dom Malan, Hospital Esperança, Hospital Jesus Nazareno, Instituto Materno Infantil (IMIP) e Maternidade Professor Monteiro de Moraes (CISAM)¹².

Dentre os serviços acima citados, destacam-se o IMIP, que é um Centro de Referência Nacional em Aleitamento e pri-

meiro do Brasil a receber o título de Hospital Amigo da Criança em 1992⁹⁷ e o HAM que, além de possuir o título de Hospital Amigo da Criança desde 1995, é responsável pelo processamento do leite ordenhado in loco, como também de amostras do Hospital Bandeira Filho e da Maternidade Barros Lima. Estes dois últimos hospitais não possuem BLH, apenas Postos de Coleta de Leite Materno. Nos Bancos de Leite, o leite materno, após ordenha asséptica e num prazo máximo de 15 dias a partir de sua coleta, deve ser pasteurizado e passar por um rigoroso controle da qualidade, a fim de disponibilizar um produto com alto valor nutritivo e isento de contaminação⁰¹.

Segundo Costa⁰⁴, a pasteurização é o tratamento aplicado ao leite humano, que visa a inativação térmica de 100% das bactérias patogênicas e 90% de sua flora saprófita, através do binômio temperatura/tempo de 62,5°C durante 30 minutos, baseado na inativação térmica da *Coxiella burnetti*.

No que se refere à análise do leite pasteurizado, segundo a Rede BLH12, “o cultivo dos indicadores deve ser simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-positivos”. Por este motivo, novos métodos são propostos e alguns aceitos ao se enquadrarem nestas exigências.

Atualmente, o controle da qualidade do leite humano é realizado através da análise microbiológica proposta por Novak e Almeida¹⁰, utilizada, desde então na rotina dos

Recebido em 25/11/2008

Aprovado em 08/02/2010

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Agamenon Magalhães em reunião realizada em 25 de agosto de 2005.

¹Especialização em Análises Clínicas pela Faculdade Frassinetti do Recife e Responsável por Análise de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães.

²Doutora em Ciências dos Alimentos e Professora Assistente da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Bancos de Leite do país, que verifica a presença ou ausência de coliformes totais no leite pasteurizado através de cultura em Caldo Verde Bile Brilhante Lactose por 48 horas em estufa. Anteriormente a esta, o método usado era do Número Mais Provável (NMP) de coliformes¹⁰. Por outro lado, Behmer⁰³ sugeriu outra análise para garantir a qualidade do leite em escala industrial: a prova da enzima Fosfatase Alcalina.

As enzimas são substâncias capazes de acelerar reações químicas sem serem consumidas nem compor no produto final da reação, sendo inativadas ou decompostas pela ação de ácidos e bases fortes, certos tóxicos ou pelo calor⁰⁵. A Fosfatase Alcalina, enzima termossensível, está presente em praticamente todos os tecidos do organismo, sendo a óssea e a hepática muito conhecidas clinicamente^{06,11}. Esta enzima catalisa a hidrólise de ésteres fosfóricos que, dentre outras funções, auxiliam na mineralização óssea^{09,11}.

No leite cru, a fosfatase alcalina está sempre presente e é totalmente destruída em aquecimento e temperaturas ótimas^{03,13,14,16}. Com base nesta informação, em 1933, Kay e Graham sugeriram a primeira reação de fosfatase no leite^{03,14,16} para verificar a eficiência da pasteurização. Segundo estes autores e VARNAM e SUTHERLAND¹⁵, ela é totalmente inativada a uma temperatura de 62°C por 30 minutos.

A primeira prova de Fosfatase Alcalina baseava-se em incubar o leite com "fenil fosfato dissódico", liberando fenol e a cor produzida era comparada com o comparador de Lovibond, que não poderia exceder 2,3 unidades azuis de Lovibond^{03,14}.

Segundo Vilas¹⁶, até 1960 a prova de Kay e Graham foi utilizada como a prova oficial de fosfatase, sendo depois substituída pela reação, mais rápida, de Aschaffenburg e Mullen – modificada por Tramer e Wight em 1963 – usada oficialmente para leite pasteurizado em escala industrial. Esta reação consiste em incubar de 1 a 5 mL de leite em para-nitrofenil-fosfato dissódico, devidamente tamponado, por 2 horas em 37/38°C. Se houver fosfatase, a solução apresentará uma cor amarela, devido a formação de nitrofenol, que deve ser comparada ao disco de Lovibond, graduado em µg de para-nitrofenol/mL de leite. O resultado deve ser menor ou igual a 10 µg de para-nitrofenol/mL.

Por outro lado, Behmer⁰³ enfatiza que esta prova pode durar de 30 minutos, prova rápida, a 24 horas, prova lenta. Atualmente, existem métodos bem mais rápidos e seguros, como, por exemplo, as tiras de Fosfatase Alcalina (gráfico 1). Essas tiras utilizam o mesmo princípio da reação oficial para a indústria de leite, sendo mais rápidas e fáceis de visualização. Varnam e Sutherland¹⁵ descrevem as análises realizadas nos diversos tipos de leites de vaca em escala industrial e os testes enzimáticos, inclusive a prova da fosfatase alcalina, é obrigatória para estes leites.

Segundo Schönherr¹³, qualquer tipo de pasteurização destrói a fosfatase láctea e, por isso, a análise por esta enzima, pode ser utilizada para verificar a higiene do leite submetido a este processo.

Como caracteriza Torre¹⁴, a prova da fosfatase alcalina, pela sua facilidade e rápida execução, constitui um elemento fundamental de análise precoce de uma boa pasteurização. Mesmo com vantagens de execução rápida e eficaz, a prova da fosfatase alcalina, ainda não é aplicada na avaliação do leite humano. Diante do exposto, surgiu a necessidade de comparar a análise microbiológica e a prova da fosfatase, cujo objetivo comum, visa verificar a eficiência da pasteurização e avaliar as vantagens deste novo método para a qualidade do leite humano oferecido em Banco de Leite Humano do Recife.

Amostras de 200 mL de leite materno foram coletadas em vidros estéreis, no Banco de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães, de nutrizas doadoras, com no máximo dez dias de pós-parto, durante o período de setembro de 2005 a abril de 2006.

Para a seleção físico-química dos leites, foram usados os padrões de acidez e crematócrito afixados nas normas da ANVISA⁰¹: com acidez menor ou igual a 8°D (graus Dornic) e com crematócrito maior ou igual a 250Kcal/L, respectivamente.

O tamanho amostral foi de 75 amostras, nas quais foram realizadas em triplicata, num total de 225 análises, distribuídas em três grupos: Grupo A (controle), com 25 amostras de leite cru para testar a eficiência do kit da Fosfatase Alcalina (tiras) e provar que as amostras cruas continham Fosfatase Alcalina; Grupo B, constituído de 25 amostras de leite pasteurizado para análise microbiológica e Grupo C, com 25 amostras de leite pasteurizado para análise da Fosfatase Alcalina.

As amostras de leite cru foram submetidas à seleção inicial recomendada e, após, colhidas alíquotas de 5 mL em tubos de ensaio estéreis com o auxílio de pipetas estéreis. A seguir, as amostras do Grupo A foram pasteurizadas no Banco de Leite, conforme normas do Ministério da Saúde¹², sendo, em seguida, colhidas duas amostras: uma para o Grupo B e a outra para o Grupo C.

Do total de amostras do Grupo B, 50 foram enviadas ao Laboratório Central Julião e as 25 restantes, ao Laboratório Central do Estado (LACEN), conforme prática usual neste hospital.

1. Determinação microbiológica

A análise microbiológica de leite humano utilizando Caldo Verde Brilhante segue as normas afixadas pela ANVISA⁰¹, baseada no estudo de Novak e Almeida¹⁰, o qual consiste em incubar 4 mL de leite pasteurizado em meio de cultivo com Caldo Verde Bile Brilhante Lactose.

O Caldo Verde Bile Brilhante Lactose foi preparado na concentração de 50g para cada litro de água recém-destilada, distribuído em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan – 10mL em cada tubo – e autoclavado a 121°C por 15 minutos. A seguir, acrescentou-se 4mL da amostra a ser analisada e incubou-se a 36°C ±1°C por 24 a 48 horas. A presença ou ausência de gás no tubo de Durhan indica, respectivamente, teste positivo ou negativo para coliformes. Nos casos positivos, o resultado era confirmado através de nova inoculação, em tubos de 40g/L de água recém-destilada, desta amostra com o auxílio de uma alça de platina e incubadas novamente a 36°C±1°C por 24 a 48 horas.

2. Determinação da Fosfatase Alcalina

Para a realização da prova da enzima Fosfatase Alcalina no leite foram utilizadas tiras reagentes da Laborclin⁰⁸ – kit da prova de Fosfatase Alcalina no leite, em tiras, Cód. 917000, Lote 50815014 -, onde se adicionou 1 mL da amostra em um tubo de ensaio, o suficiente para imergir a parte reagente da tira, aguardar 2 a 3 minutos e, a seguir, realizar a leitura. Nos casos negativos, as tiras foram incubadas em estufa por uma hora, a 37°C, a fim de confirmar o resultado. Foi considerado resultado positivo (presença da enzima), quando a parte reagente da tira apresentou coloração amarela, e negativo (ausência da enzima) quando não apresentou coloração ou uma coloração amarelo-pálida.

Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados e avaliados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates nos casos necessários, para verificar a existência de diferença significativa entre as duas análises.

RESULTADOS

Resultados e Discussão

Os resultados das análises para a fosfatase alcalina estão apresentados na figura 01. No Grupo A, observou-se que em todas as amostras analisadas o resultado foi positivo para a enzima. Isto mostra que o kit se comporta de forma eficaz, pois no leite cru a FA está presente.

Após a pasteurização, todas as amostras dos grupos B e C mostraram resultado negativo (figura 1), indicando que a pasteurização foi realizada com sucesso.

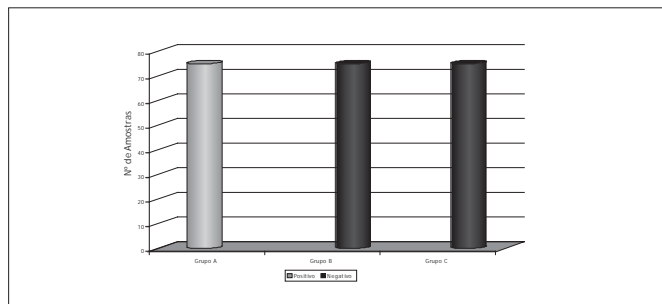


Figura 1. Resultado das análises para a fosfatase alcalina (FA) no leite cru (Grupo A), e no leite pasteurizado (Grupos B e C)

Foi visualizada nítida diferença de coloração do leite cru (grupo A), para o leite pasteurizado (grupo C), positivo e negativo, respectivamente, conforme observa-se na figura 02.



Figura 2. Amostras de tiras de Fosfatase Alcalina. Em cinza, amostra de leite cru, e em pálida, mesma amostra após pasteurização.

Os dados obtidos de ambas as análises, quando submetidos à análise estatística, mostraram um valor do χ^2 de 73,0133, enquanto que o valor crítico para alfa de 1% e 5% é de 6,63 e 3,84, respectivamente. O valor do χ^2 calculado foi maior que o valor do χ^2 tabelado ao nível de significância de 1% e 5%, portanto não há diferença significativa entre ambas as análises.

No que se refere ao tempo de liberação dos resultados, o Laboratório Julião enviou a análise numa média de 13 dias, enquanto que o LACEN, em 26 dias.

DISCUSSÃO

Segundo a REDE BLH¹², o leite humano processado em Bancos de Leite Humano deve passar por rigoroso contro-

le da qualidade, sendo atualmente utilizado o Caldo Verde Brilhante para este controle. No entanto, Behmer⁰³ refere que a Fosfatase Alcalina – FA - é totalmente inativada no leite pasteurizado corretamente, e isto lhe concede a função de ser um indicador de eficácia deste procedimento. Schönherr¹³ cita que qualquer tipo de pasteurização, da lenta à rápida, é capaz de destruir a fosfatase alcalina e que os microrganismos presentes no leite são destruídos, em geral, mais rapidamente do que a fosfatase. Por isso, ele recomenda que a análise desta substância seja utilizada como regulador do “efeito higiênico” da pasteurização. Neste estudo, comprovou-se que o kit de FA utilizado se comporta de forma eficaz, ao nível de significância de 95%, pois no leite cru a FA deve estar presente^{03,13,14,15,16}, sendo, portanto, detectada em todos os leites crus analisados e ausente nos leites pasteurizados, fato também confirmado em 100% das amostras.

Torre¹⁴, em 1966, já se referia à prova da FA como de fácil e rápida execução, além de ser útil na identificação precoce de um processo adequado de pasteurização. Isso corrobora com um dos objetivos da Rede BLH é expansão dos Bancos de Leite Humano no Brasil¹², para atingir a maior parte da população e reduzir a mortalidade infantil, um método mais rápido, prático e de menor custo, beneficiaria o processamento do leite em unidades menores que precisariam, ou precisam, de mais recursos e equipamentos para sua manutenção.

Neste enfoque, o estudo apresentou diferença significativa entre os métodos. No método usual – Caldo Verde Brilhante, baseado no estudo de Novak e Almeida¹⁰ -, há necessidade de grande quantidade de material, de maior espaço de tempo e de mão-de-obra para preparo do meio de cultura, que tem como passo seguinte incubar por 48hs em estufa. Por outro lado, o método proposto já está pronto para uso, obtendo-se resultado imediato ou em até uma hora – tempo necessário para comprovar o resultado negativo – além de haver sensível redução de material, tempo e mão-de-obra. O método usual, em alguns serviços, necessita ainda de transporte para envio de material aos laboratórios externos, pois este procedimento não é realizado no próprio hospital. No entanto, este novo método pode ser realizado “in loco”, diminuindo também os custos com transporte.

Para a Rede BLH¹², “o cultivo dos indicadores deve ser simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-positivos”. Portanto, sendo a análise da FA tão eficaz quanto à microbiológica, com a vantagem de ser mais fácil de ser executada e de otimizar tempo e custo, poderia ser aplicada em larga escala, em toda a Rede BLH, em substituição à comumente usada, ou, ainda, ser utilizada como primeira prova para garantir a qualidade do leite pasteurizado, disponibilizado pelos Bancos de Leite Humano.

AGRADECIMENTOS

À Cândida Rodrigues, chefe do Banco de Leite Humano na época do estudo, e à Natália Matsushita, gerente da Patologia Clínica, ambas do Hospital Agamenon Magalhães, por permitirem a execução deste estudo nas dependências dos respectivos serviços. E à empresa Laborclin Produtos para Laboratório LTDA por ceder as tiras de fosfatase alcalina necessárias à realização deste.

REFERÊNCIAS

01. ANVISA. Regulamento técnico para funcionamento de Banco de Leite Humano (BLH). Disponível no site: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 09 jul. 2005.
02. BARROS, V. R. M.; PANETTE, J. C.; PERES, F. M. C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo – Brasil. Revista Higiene Alimentar 3: 199-206, 1984.
03. BEHMER, M. L. A. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvete e instalações. São Paulo, Nobel, 1984.
04. COSTA, M. L. Pasteurização: Garantia de qualidade para doação de leite materno. Disponível no site: <http://www.aleitamento.com/a_artigos.asp?id=9&idartigo=774&id_subcategoria=20>. Acesso em 13 mar. 2005.
05. DEMETER, K. J.; ELBERTZHAGEN, H. Elementos da microbiologia lactológica. Zaragoza, Acribia, 1971.
06. FOSFATASE ALCALINA. 2005. Disponível em: <http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/fosfatase_alcalina.shtml>. Acesso em 12 mar. 2006.
07. IMIP. Banco de Leite Humano. Disponível no site: <<http://www.imip.org.br>>. Acesso em 06 ago. 2005.
08. LABORCLIN. Controle microbiológico de leite. 2006. Disponível em: <<http://www.laborclin.com.br>>. Acesso em 25 mar. 2006
09. MAURO, S. M. Z. D. Genes codificando as fosfatases alcalinas em camarão. 2005. Disponível em: <[http://www.shrimp.ufscar.br/datamining/Sonia\(1\).php](http://www.shrimp.ufscar.br/datamining/Sonia(1).php)>. Acesso em 12 mar. 2006.
10. NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. Jornal de Pediatria 78: 193-196, 2002.
11. PENIDO, M. G. M. G. Alterações ósseas na hipercalcúria idiopática em crianças e adolescentes. Pediatric Nephrology 18: 133-139, 2003.
12. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano – REDE BLH. Manual técnico. Disponível no site: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/index.php?pagina=port/manual/pasteurizacao.htm&men=2&submen=6>>. Acesso em 09 jul. 2005.
13. SCHÖNHERR, W. Manual practico de analisis de leche. Zaragoza, Acribia, 1959.
14. TORRE, G. D. Scienza del Latte: Metodi e tecniche per il risanamento. Bologna, Edagricole, 1966.
15. VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnologia, química y microbiología. Zaragoza, Acribia, 1995.
16. VILAS, J. M. T. Manual de plantas de pasterización. Zaragoza, Acribia, 1971.
17. VINHA, P. V. H. Amamentação materna: Incentivo e cuidados. São Paulo, Sarvier, 1987.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Elma Freitas do Nascimento
Rua Professora Lourdes Dutra, nº 59, Água-Fria
Cep: 52130-010. Recife – PE.
E-mail: elmafreitas@yahoo.com.br.

TEAC

Título de Especialista em Análises Clínicas

A avaliação prática do
conhecimento em análises clínicas.

Valorize a sua profissão
e sua carreira

Inscreva-se!!!

www.sbac.org.br

Realização:



Controle de qualidade de técnicas realizadas nos laboratórios de parasitologia da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Salvador, Bahia

Quality control of the parasitological techniques used in the laboratories of clinical analyses of the Department of Health of the Salvador City, Bahia

Souza¹ R.F. & Amor² A.L.M.

RESUMO - As infecções por enteroparasitos estão entre os mais frequentes agravos infecciosos, estimando-se que o número de infectados no mundo seja de aproximadamente 3.5 bilhões de pessoas e no Brasil, 130 milhões de habitantes são acometidos por alguma espécie de parasito intestinal. Desta forma, métodos laboratoriais para diagnóstico dos agentes etiológicos das doenças parasitárias intestinais são de extrema relevância. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o controle de qualidade interno nas fases do processo pré-analítico, analítico e pós-analítico utilizado nos laboratórios de Análises Clínicas da Secretaria Municipal de Saúde de Salvador em 2008, comparando-o com resultados obtidos em 2005. Detectou-se precariedade quanto à padronização e execução das técnicas nos Laboratórios de Parasitologia da Secretária Municipal de Saúde de Salvador em 2005 e 2008, evidenciando um Programa de Controle de Qualidade Interno ainda ineficaz ou inexistente.

PALAVRAS-CHAVE - Técnicas parasitológicas. Parasitos intestinais. Diagnóstico.

SUMMARY - The infections for enteroparasites constitutes a severe problem to public health, esteem that the number of infected in the world is of approximately 3.5 billion people and in Brazil, 130 million inhabitants are infected by some species of intestinal parasite. Thus parasitological techniques for diagnosis of the intestinal parasite are of extreme relevance. The objective of this work was to characterize the internal quality control in the phases of the process daily pay-analytical, analytical and after-analytical used in the laboratories of Clinical Analyses of the City department of Health of Salvador in 2008, comparing it with results gotten in 2005. Precariousness how much to the standardization and execution of the techniques in the Laboratories of Parasitology of the Municipal Secretary of Health of Salvador in 2005 and 2008 was detected, evidencing a Program of inefficacious or still inexistent Internal Quality control.

KEYWORDS - Parasitological techniques. Intestinal parasites. Diagnosis.

INTRODUÇÃO

As infecções por enteroparasitos estão entre os mais frequentes agravos infecciosos encontrados em todas as áreas geográficas do planeta, mostrando-se mais frequentes em países temperados. Estima-se que o número de infectados no mundo seja de aproximadamente 3.5 bilhões de pessoas. No Brasil, este tipo de parasitose ainda se encontra disseminada e com alta prevalência, sendo que 130 milhões de habitantes são acometidos por alguma espécie de parasito intestinal (CAMPOS *et al.* 1988; HOSHINO-SHIMIZU *et al.* 2003).

O diagnóstico clínico e acurado das parasitoses humanas é difícil, por isso deve-se buscar através do exame laboratorial o auxílio para a diferenciação do agente etiológico. Assim, para os parasitos intestinais e do sangue a demonstração morfológica do(s) estágio(s) de diagnóstico é o principal meio para estabelecer uma diagnose diferencial e definitiva. Para o controle de qualidade em laboratório de Parasitologia Clínica há uma preocupação em evitar o diagnóstico laboratorial incorreto, que tem em sua origem dois tipos de erros: erros de procedimento pelo uso incorreto do microscópio, da preparação inapropriada dos esfregaços, da deficiência do exame ao longo das etapas de preparação, de uma observação rápida das preparações, da falha no uso de aparelhos de medida, do erro de técnicas; erros de interpretação ocorrem pela falta de conhecimento das várias espécies, da presença de artefatos (como no caso dos exames de fezes), das variações morfológicas apresentadas por micro-organismos (DE CARLI e OLIVEIRA, 2001).

No que diz respeito aos parasitos intestinais, a maioria é diagnosticada pelo exame de fezes, embora outros materiais, como urina, escarro, secreções urogenitais, aspirados, tecidos, conteúdo duodenal e espécimes obtidos por biópsia, possam ser utilizados para a identificação de certas espécies (PRICE, 1993).

Uma identificação segura e correta de um parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem feita e a uma boa preservação dos espécimes. Um material fecal inadequadamente escolhido, velho ou mal preservado será de pequeno valor para o diagnóstico (DE CARLI, 2001).

Métodos laboratoriais para diagnóstico das doenças parasitárias são de extrema relevância. Há uma variedade em metodologias que permite o reconhecimento de espécies de parasitos, tanto específicas, quanto aquelas de concentração destinadas à observação de diferentes formas evolutivas (MARIANO *et al.* 2005).

Apesar da existência de inúmeros métodos, qualitativos e quantitativos, propostos para o exame parasitológico de fezes, todos tem sido objeto de críticas variadas, quer pela complexidade e baixa sensibilidade quer pelo elevado custo de execução, restringindo suas utilizações na rotina laboratorial de exame de fezes (CHAVES *et al.* 1979).

O nível da *performance* de qualquer diagnóstico de laboratório em Parasitologia Clínica é um reflexo direto do treinamento e da qualificação do pessoal técnico, dos recursos do laboratório e dos esforços positivos concernentes à melhoria do desempenho. A aplicação dos procedimentos de Controle de Qualidade (CQ) para o diagnóstico parasitológico

Recebido em 12/11/2008

Aprovado em 21/01/2010

¹Acadêmico do Curso de Farmácia - Faculdade de Tecnologia e Ciências

² Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

E-mail: rodrigofersou@bol.com.br

gico talvez ainda não apresente regras rígidas em consequência da indefinição e do equacionamento dos diferentes procedimentos de diagnóstico. O CQ é realizado através do monitoramento da metodologia empregada na realização de um processo analítico (ASH e ORIEHL, 1991).

O CQ inclui: **a)** preparação adequada, armazenamento e preservação dos espécimes submetidos ao diagnóstico; **b)** avaliação permanente dos reativos e reagentes; **c)** monitoramento do equipamento; **d)** correta supervisão e treinamento periódico da equipe técnica; e) uso de manuais de procedimentos, revistas específicas e referências bibliográficas, as quais sempre deverão estar à disposição dos técnicos e analistas dos laboratórios (DE CARLI, 1994).

Todas as atividades realizadas pelo laboratório são diretamente conduzidas por um programa de Garantia da Qualidade (GQ) que assegura a qualidade de todo o processo. As Boas Práticas Laboratoriais (BPL) são normas, dispostas neste programa, que disciplinam a organização, o funcionamento e as condições sob as quais os exames são planejados, registrados, liberados e como as amostras são preservadas e descartadas e os resultados arquivados. Essas normas incluem: atividades pré-analíticas (treinamento do pessoal técnico, preparação do paciente, colheita da amostra, qualidade e volume das amostras, transporte e identificação das amostras); atividades analíticas (manual de procedimentos para processamento dos espécimes e identificação dos parasitos em seus estágios de diagnóstico; descrição dos métodos e / ou das técnicas; plano de ação corretiva quando os resultados esperados não são obtidos); atividades pós-analíticas (informações verbais, escritas ou por meios eletrônicos, do laboratório ao clínico, permitindo tratamento imediato do paciente; informações relacionadas com a qualidade dos espécimes fecais) (GARCIA e BRUCKNER, 1997).

O CQ interno, um dos componentes do programa de CQ, consiste na documentação do correto funcionamento dos reagentes e equipamentos em determinados intervalos de tempo e na avaliação da *performance* das amostras individuais, e, dentro de cada lote, na realização de estudos de reprodutibilidade. No CQ interno, é necessário e importante seguir as seguintes fases: a) controlar o corante após nova preparação (ou quando um novo número de lote é comprado) e anotar o período de validade no rótulo do frasco; b) controlar semanalmente os métodos de coloração permanente com amostras positivas e registrar todos os resultados do CQ; c) quando amostras positivas não são disponíveis, usar fezes contendo células epiteliais ou pus (STERWART e KOEPKE, 1989).

Todo laboratório de Parasitologia deve ser submetido a programas de proficiência (Controle de Qualidade Externo) para pôr em prática uma imparcial avaliação dos procedimentos de diagnóstico. O controle deve ser aplicado a todas as áreas da Parasitologia. A existência de um material de referência é de importância primordial na comparação das amostras clínicas com os organismos desconhecidos durante os treinamentos regulares e no treinamento dos novos analistas. O material ideal inclui: ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários intestinais preservados no formaldeído; esfregaços permanentes corados para o estudo de oocistos, cistos e trofozoítos de protozoários intestinais; slides coloridos, atlas, livros, cartazes fixados às paredes e manuais de diferentes autores usados como materiais de referência, indispensáveis para o funcionamento de qualidade do laboratório (NEIMEISTER, 1992).

O manual de procedimentos deve conter as instruções e informações específicas para todo o laboratório. O uso cor-

reto do manual reduzirá os erros e irá impedir que as condutas comprometedoras não se tornem procedimentos de rotina (DE CARLI, 1994).

Para realizar o controle interno da qualidade em laboratório de Parasitologia os técnicos deverão ser submetidos a treinamentos constantes para capacitação sobre o tema.

Um dos cuidados primordiais é quanto à qualidade do processamento e análise da amostra, onde se pode oferecer com certa frequência, ao nível de teste, uma amostra sabidamente positiva e comparar com os resultados obtidos pelos técnicos, visando com isso, uma fidedignidade e confiabilidade nos resultados gerados no laboratório (MELVIN e BROOKE, 1982; NEIMEISTER, 1992; GARCIA e BRUCKNER, 1997).

Existe, em consequência do que foi exposto, a necessidade imediata de um correto e preciso diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, descartando, desta forma, o surgimento de resultados falso-positivo e/ou falso-negativo, no qual pode levar a um tratamento inadequado ou desnecessário para o paciente. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o controle de qualidade interno nas fases do processo analítico (pré-analítico, analítico e pós-analítico) quanto às análises de parasitológico de fezes utilizado nos laboratórios de Análises Clínicas da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Salvador, estado da Bahia, no ano de 2008, comparado a resultados obtidos em 2005 em laboratórios da rede. Este trabalho faz-se de grande importância para gestores públicos e profissionais farmacêuticos, pois os resultados obtidos poderão subsidiar tomada de decisões serem implantadas para garantir a qualidade e confiabilidade dos exames prestados à população.

MATERIAL E MÉTODOS

Participaram do presente estudo seis laboratórios de Análises Clínicas situados no município de Salvador, coordenados pela Secretaria Municipal de Saúde, onde se observou, em cada um dos laboratórios, dados sobre "*Controle de Qualidade Interno no setor da Parasitologia*". A coleta de dados foi realizada em visita aos Laboratórios selecionados, a partir de aplicação de questionário contendo abordagens sobre os processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, no qual envolve as metodologias utilizadas para os exames de Parasitologia. As informações prestadas por farmacêutico clínico responsável pelo setor. O período para a coleta compreendeu os meses de janeiro a abril de 2008. Os resultados foram comparados aos obtidos no ano de 2005 (SOUZA *et al*, 2005; SOUZA e AMOR, 2008) e digitados no programa Microsoft Excel para confecção de tabelas e gráficos e, posteriormente, analisados pelo programa EpiInfo versão 3.3.2.

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Tecnologia e Ciências. A identificação dos laboratórios mantida em sigilo, assegurando o anonimato e a confidencialidade das informações, não constando nomes dos locais nas bases de dados e os resultados apresentados à Secretária Municipal de Saúde do Município de Salvador – Bahia.

RESULTADOS

Nos seis laboratórios pesquisados em 2008, observou-se que as técnicas mais utilizadas foram: sedimentação espontânea (n = 3), seguida de sedimentação por centrifugação (n = 3). Em 2005, seis laboratórios realizavam a técnica da sedimentação espontânea; dois laboratórios, sedimentação por centrifugação e, três laboratórios a técnica

de Baermann-Moraes. Dados comparativos mostrados na Figura 1.

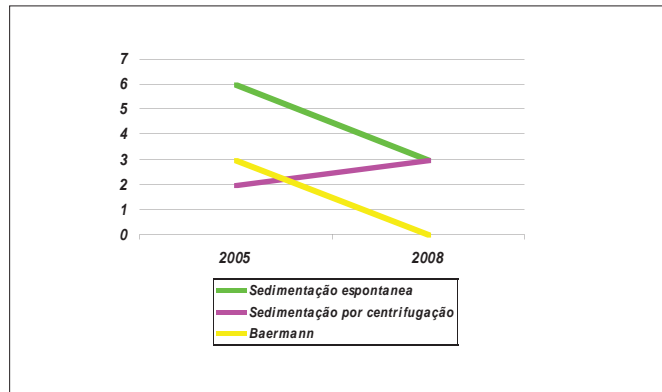


Figura 1 - Principais técnicas utilizadas em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde no período de 2005 e 2008.

Na Figura 2, nota-se que, para 2008, o tempo entre a coleta e análise das amostras variou entre 3 horas (n = 2) e 24 horas (n = 2), já em 2005, o tempo máximo entre a coleta e a análise das amostras foi de 4 horas (n = 3).

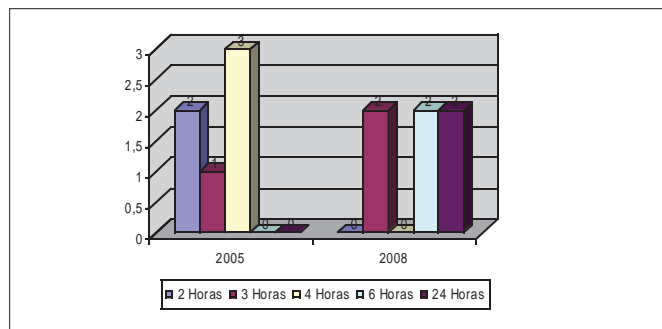


Figura 2 - Tempo decorrido entre a coleta e análise das amostras em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde de Salvador em 2005 e 2008.

Na Figura 3, observou-se que a maioria dos laboratórios em 2008, (n = 4), mantém suas amostras acondicionadas em temperatura ambiente até o momento da análise. Fato verificado em todos os laboratórios analisados em 2005 (n = 6).

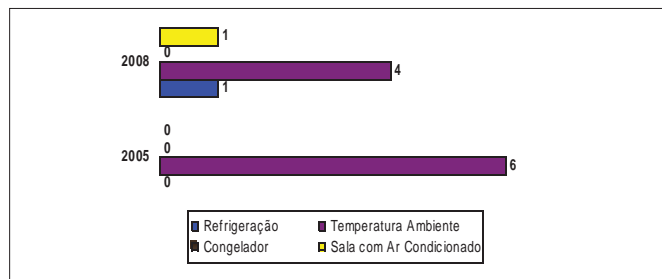


Figura 3 - Principais formas de acondicionamento das amostras no período entre a coleta e análise em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde de Salvador em 2005 e 2008.

Dos seis laboratórios pesquisados em 2008, apenas três registram em seus laudos dados observados não restritos ao registro de formas parasitárias, como por exemplo, presença de sangue (n = 1) (dado macroscópico), seguido de leucócito (n = 2) (dado microscópico). Dados comparativos dos períodos 2005 e 2008 dispostos na Figura 4.

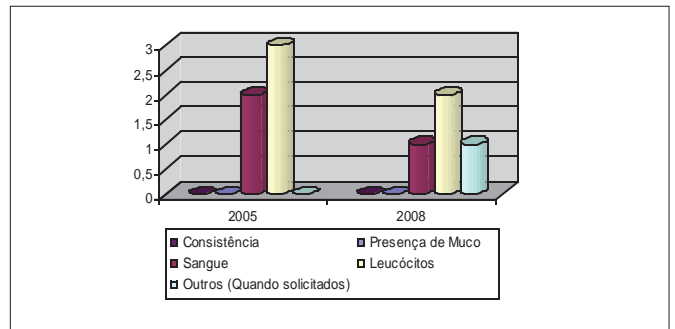


Figura 4 - Dados macro e microscópicos registrados nos laudos de seis laboratórios de Análises Clínicas da rede municipal de saúde de Salvador em 2005 e 2008.

De acordo com a Figura 5, pode-se analisar que para os procedimentos, a água potável (tratada pela empresa baiana responsável) é utilizada por todos os laboratórios (n = 6) para o ano de 2008 - no estudo realizado em 2005, esse perfil variou.

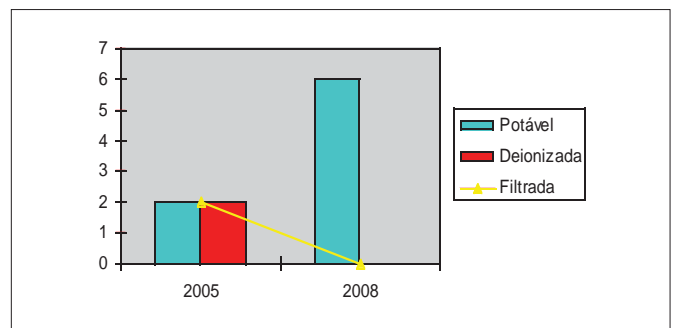


Figura 5 - Tipo de água utilizada nos procedimentos parasitológicos em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde em 2005 a 2008.

Com relação à quantidade de lâminas que são lidas pelos técnicos para cada amostra fecal analisada nos diferentes laboratórios, observa-se que, em 2008, em cinco deles ocorrem leitura de apenas duas lâminas, seguido de um laboratório que realiza leitura de três lâminas. Em 2005, em todos os laboratórios pesquisados (n = 6) ocorria leitura de apenas duas lâminas para cada amostra. Como demonstra a Figura 6.

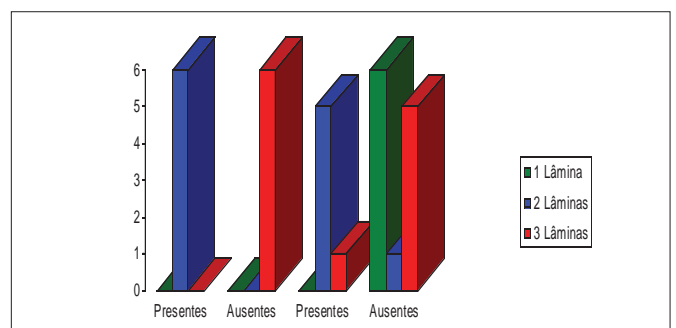


Figura 6 - Quantidade de lâminas utilizadas para leitura de cada amostra em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde de Salvador - 2005 e 2008.

Na Figura 7, observa-se que todos os laboratórios pesquisados em 2008 utilizam para suas análises o emprego de apenas um método para diagnóstico de parasito intestinal (n = 6); em 2005, a maioria também utilizava apenas um método.

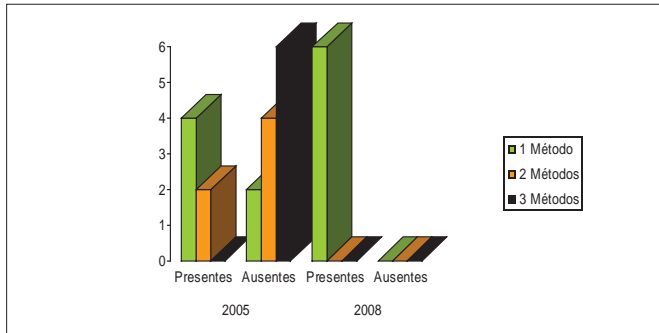


Figura 7 - Quantidade de métodos utilizados para análises das amostras em seis laboratórios de Análises Clínicas da Rede Municipal de Saúde de Salvador em 2005 e 2008.

No que refere a participação dos laboratórios em programas de proficiência (Controle de Qualidade Externo), nenhum deles vincula-se a esse controle, tanto em 2005, quanto em 2008 (Figura 8).

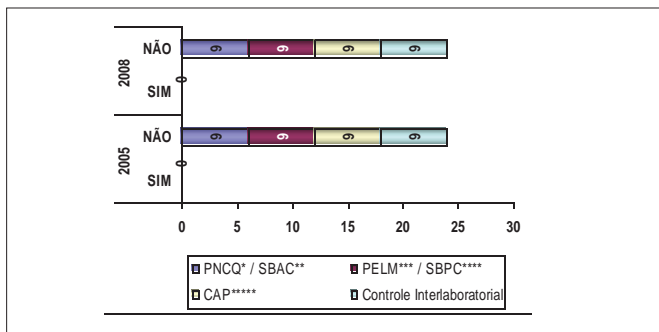


Figura 8 - Participação em programa de proficiência (Controle Externo de Qualidade) em 6 laboratórios de Análises Clínicas da rede municipal de saúde de Salvador em 2005 e 2008.

Em relação ao treinamento dos colaboradores para realização das atividades técnicas em laboratório de Parasitologia, observa-se em dois laboratórios, para o ano de 2008, presença de treinamento quando há instalação de um novo equipamento. No estudo feito em 2005, os treinamentos não eram realizados (Figura 9).

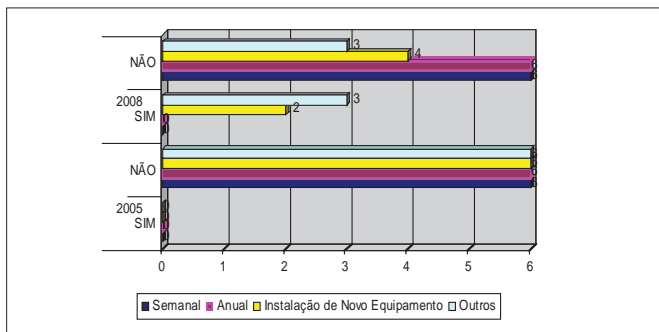


Figura 9 - Forma de treinamento dos colaboradores na realização das atividades técnicas da Parasitologia em 6 laboratórios de Análises Clínicas da rede municipal de saúde de Salvador em 2005 e 2008.

Conforme Figura 10, verifica-se que (n = 3) laboratórios, treinam seus funcionários por manutenção de amostras positivas para revisão, seguido de leitura por diferentes técnicos de mesma amostra – verificada em (n = 3) laboratórios e de outras metodologias. Em 2005, esse treinamento não foi registrado.

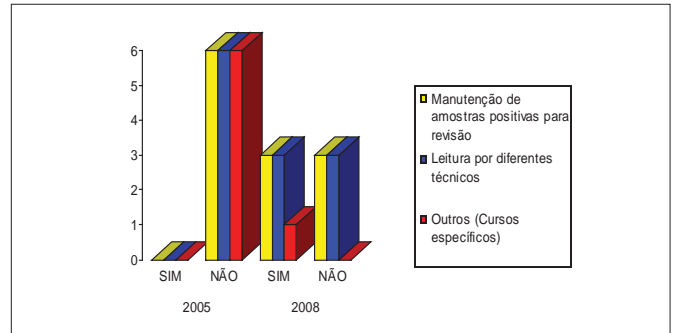


Figura 10 Tipos de treinamento em seis laboratórios de Análises Clínicas da rede municipal de saúde de Salvador em 2005 e 2008.

Dos seis laboratórios pesquisados, apenas um (n = 1), possui Procedimento Operacional Padrão (POP) para realização das técnicas de exames parasitológicos de fezes (Figura 11). Dados de 2005 para este tópico não foram relatados.

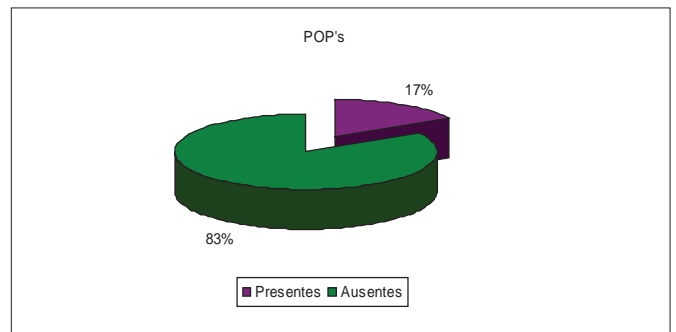


Figura 11 - Presença de POP's em seis laboratórios de Análises Clínicas da rede municipal de saúde de Salvador em 2008.

DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados, há uma fragilidade quanto ao tipo de técnica parasitológica utilizada, podendo levar a um aumento de resultado falso-negativo, visto que a técnica mais e/ou somente utilizada é Sedimentação Espontânea (Figura 1). Como registrado por Lima (1992) e Neves (2000), este método é indicado principalmente para a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* servindo também para a pesquisa de ovos e larvas de outros helmintos, limitado ou de nenhuma expressão para a pesquisa de ovos leves como o de *Enterobius vermicularis*, cistos e oocistos de protozoários.

Não existe um método capaz de diagnosticar, ao mesmo tempo, todas as formas parasitárias. Alguns são métodos mais gerais, permitindo o diagnóstico de vários parasitos intestinais, além de serem de fácil execução e pouco dispendiosos, por isso utilizados na rotina. Contudo, o emprego de técnicas específicas na rotina laboratorial é fundamental, contribuindo dessa forma para a diminuição de resultados falso-negativos, visto que algumas espécies de parasitos só são evidenciados por técnicas especiais. Um exame isolado em que o resultado é negativo, não deve ser conclusivo. Além disso, a produção de cistos, ovos ou larvas não é uniforme ao longo do dia ou do ciclo do parasito e o material deve ser analisado o mais rápido possível. Quando é solicitada a pesquisa de um parasito em especial, devem ser executados, concomitantemente, o método geral e o específico, pois outros parasitos não seriam diag-

nosticados se fosse executado apenas o método específico (NEVES, 2000; DE CARLI, 2001). No entanto, na maioria das vezes, tal procedimento é inviável, seja por quantidade insuficiente de fezes, ou pelo elevado número de exames a serem realizados por dia (NEVES, 2000). Porém, o uso de pelo menos uma segunda técnica, como por exemplo o Baermann para a pesquisa de larvas de *Strongyloides stercoralis* deve ser implementado. A diminuição do uso da mesma no período de 2008 em comparação ao período de 2005 (Figura 1) pode ter induzido a resultados falso-negativos em amostras positivas para *S. stercoralis*, ocasionando o possível não tratamento do paciente, contribuindo cada vez mais para o aumento da morbidade por doenças parasitárias devido ao diagnóstico inadequado realizado pelos laboratórios.

Para o parasitológico de fezes, é recomendável a repetição do exame com outra amostra, no caso de resultado negativo (NEVES, 2000) - fato não pesquisado sobre ocorrência nos laboratórios visitados nos períodos de 2005 e 2008.

Os resultados de 2008 quando comparados com o estudo feito em 2005, (Figura 1), demonstram não existir melhoria com relação a introdução de técnicas mais específicas na rotina laboratorial, mostrando que nada foi feito para a melhoria das análises parasitológicas com relação ao emprego de técnicas mais específicas, o que garantiria, dessa forma, exames mais confiáveis à população.

Quanto ao tempo decorrido da chegada da amostra fecal ao laboratório até o seu processamento, bem como à temperatura a qual a amostra é mantida, podem interferir de forma irreversível na qualidade do material que será analisado, comprometendo o resultado da sua análise. Quando amostras fecais não são coletadas adequadamente, elas terão pouco ou nenhum valor para diagnósticos precisos, principalmente para protozoários. Em uma a duas horas trofozoítos começam a degenerar-se, levando a alterações na aparência que podem resultar numa identificação errônea. Amostras fecais deixadas por várias horas ou de um dia para outro, sob altas temperaturas, pode levar à deterioração de formas evolutivas de protozoários, levando a resultados falso-negativos. Ovos de helmintos são menos afetados pelo tempo das amostras que os protozoários, mas podem ocorrer alterações em sua estrutura dificultando a identificação. As larvas em fezes velhas podem degenerar-se, o que tornará impossível a identificação das espécies. Para que amostras que chegam aos laboratórios sejam de qualidade para análise, faz-se necessário esclarecimentos da população pelos profissionais, orientando que utilizem recipientes limpos e secos para coletar as fezes, que as mesmas não deve ser misturadas a sujeiras pois esse fator poderá interferir nos exames e além disso introduzir organismos de vida livre do solo, o que poderá causar problemas na identificação de espécimes. Deve-se evitar também misturar as fezes com urina e água para evitar a destruição de trofozoítos se presentes. É de fundamental importância que os pacientes sejam orientados a trazer a amostra o mais cedo possível após a coleta, pois dessa forma previne-se as alterações morfológicas de protozoários e helmintos. As amostras diarreicas ou que contenham sangue e muco devem ser analisadas assim que chegarem ao laboratório (OMS, 1999). Caso as amostras não possam ser analisadas logo, as mesmas deverão ser mantidas sob temperaturas adequadas, sob refrigeração (4 - 5 °C), ou na área mais fria do laboratório. Os dados deste estudo sugerem possível comprometimento do produto final obtido pós-análise da amostra, visto que em alguns laboratórios, o tempo decorrido desde a chegada da amostra no laboratório até a sua

análise, chega a demorar 24 horas e que grande parte das amostras não são refrigeradas, mas mantidas em temperatura ambiente (Figura 2).

O registro nos laudos dos aspectos macro e microscópio é fundamental, pois contribui para fundamentar o diagnóstico do paciente. Dos seis laboratórios pesquisados, poucos informam nos laudos presença de outros materiais juntamente com a ocorrência ou não de formas parasitárias (Figura 4). O registro macro e microscópico de outros materiais é de grande importância para o diagnóstico do paciente, pois a informação desses elementos nas amostras fecais podem indicar manifestações patológicas do trato gastrointestinal; a observação quanto a consistência é muito importante, pois através desta poderá estimar as formas a serem encontradas como presença de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* em fezes líquidas, pastosas ou nas mucossangüinolentas; já nas fezes chamadas de formadas e semi-formadas poderão ser diagnosticados os cistos - fatores que auxiliam o técnico / analista que irá fazer as análises, pois lhes dará uma noção do que poderá ser encontrado. O registro da presença de sangue e leucócitos servirá para o médico como indicadores para um diagnóstico mais preciso para o paciente. Ao comparar os resultados de 2005 e 2008, verifica-se que não houve um aumento significativo do registro desses elementos nos laudos por estes laboratórios.

O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem definir o grau de pureza da água utilizada para as análises, a forma de obtenção e o controle da qualidade. Com relação ao tipo de água que os laboratórios utilizam para análise das amostras, verificou-se que todos fazem uso de água potável, coletadas diretamente das torneiras conferindo risco, pois não são feitos controles com as amostras dessa água para verificar se realmente está própria para os procedimentos, livre de organismos que venham interferir na análise das amostras. Analisando os resultados de 2005 com 2008 verificou-se que houve um descomprometimento com essa questão ao longo dos anos, pois em 2005, constatou-se que alguns laboratórios utilizavam em sua rotina água deionizada, outros usavam água filtrada e/ ou uso de água potável (Figura 5). Contudo faz-se necessário que os laboratórios voltem a programar o uso de água deionizada ou destilada em sua rotina para análise das amostras de fezes, descartando desta forma qualquer tipo de organismo que venha interferir nos resultados das amostras, sendo que após a obtenção da água deionizada ou destilada mantenha-se um controle da pureza da mesma.

Segundo a Organização Mundial de Saúde é preconizado que devem ser feitas para cada amostra parasitológica, leitura de três lâminas (OMS, 1999). De acordo com o estudo realizado em 2008, verificou-se que somente um laboratório segue o que é preconizado diminuindo dessa forma a possibilidade de resultados falso-negativos, principalmente, quando há pouca concentração de espécimes nas amostras analisadas. A maioria dos laboratórios faz uso de leitura de apenas duas lâminas por amostra. Não houve modificação entre os estudos de 2005 e 2008 neste aspecto (Figura 7). Apesar de a automação ser uma realidade em vários setores de um laboratório de análises clínicas, essa ainda não chegou ao exame de fezes, exigindo uma atenção individual a cada amostra (NEVES, 2000).

O controle de qualidade é fundamental para garantia da qualidade dos exames, pois dessa forma poderá ter um perfil das análises realizadas. No levantamento feito em 2005 e 2008, constatou-se que em nenhum dos laboratórios pesquisados existia Programa de Controle Externo da Qualidade (Figura 8), fator primordial para avaliação do

desempenho das análises, o que chama atenção, pois os laboratórios estão infringindo o que é regulamentado por lei, que todos os laboratórios clínicos devem participar de ensaios de proficiência para os exames realizados na sua rotina, e que todos os laboratórios devem assegurar a confiabilidade dos seus serviços prestados, por meio de no mínimo controle interno da qualidade e controle externo da qualidade (ensaios de proficiência), conforme Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 302 de 13 de Outubro de 2005 (RDC, 2005).

Caso a rede municipal não disponibilize de condições para adquirir ensaios de proficiência para os laboratórios deve ser implantado o controle interlaboratorial entre as unidades conforme RDC nº 302 (2005), gerando desta forma resultados dos laboratórios, estabelecendo assim uma média destes resultados contribuindo para implantação de controle pelos gestores caso o desempenho seja insatisfatório. É válido lembrar que essa medida deve ser tomada apenas quando não puder ser implantado o Controle de Qualidade nas unidades, sendo este providenciado o mais rápido possível, garantido a qualidade dos resultados por estes laboratórios.

O laboratório clínico deve promover treinamento e educação continuada aos seus funcionários mantendo disponível o registro destes e, este laboratório clínico deve dispor de instruções escritas e atualizadas das rotinas técnicas implantadas.

Com relação ao treinamento dos técnicos no estudo de 2005 e 2008, observou-se que houve um avanço, pois em 2005, nenhum dos laboratórios treinava os colaboradores das atividades técnicas da Parasitologia (Figura 9), infringindo mais uma vez a RDC nº 302 (RDC, 2005), que prevê a educação permanente aos funcionários, já em 2008, esse perfil mudou, pois a maioria dos laboratórios, treinam os técnicos, seja por manutenção de amostras positivas para revisão ou leitura por diferentes técnicos da mesma amostra (Figura 11). Podem-se comparar os resultados avaliando dessa forma a reprodutibilidade das análises executadas, sinalizando o uso de medidas corretivas caso seja necessário através dos resultados gerados por esses treinamentos. Apesar do treinamento pelos técnicos ser constatado no estudo, o mesmo é feito em condições especiais, relatados pelos próprios farmacêuticos entrevistados, realizados "de maneira eventual, conforme coordenação", "ao entrar técnicos não capacitados no setor", ou "a depender da necessidade", demonstrando que não há uma preocupação em manter a educação continuada dos funcionários, resultando desta forma uma fragilidade da rede municipal a capacitação dos funcionários.

Segundo a RDC nº 302 (2005), todo laboratório clínico e posto de coleta laboratorial devem dispor de instruções escritas e atualizadas das rotinas técnicas implantadas. O uso correto destes manuais de procedimentos irá contribuir para redução dos erros, impedindo dessa forma condutas comprometedoras que venham ser tomadas. No estudo realizado em 2008 constatou-se que apenas um laboratório, possui este manual no qual chama atenção "que na falta de um dos colaboradores, com o manual pode ser esclarecido dúvidas por outros profissionais garantindo assim, a continuidade dos serviços sem qualquer tipo de prejuízo ao andamento das atividades laboratoriais".

O Controle da Qualidade nos Laboratórios de Parasitologia da Rede Municipal de Saúde de Salvador, nos períodos pesquisados, ainda é deficiente, existindo "falhas" durante o processamento dos exames parasitológicos e expostas nos resultados. É necessário que os gestores tomem medidas corretivas o mais rápido possível para os laboratórios se

enquadrem no que é estabelecido por lei para que tenha um bom funcionamento e uma garantia de qualidade dos exames realizados.

REFERÊNCIAS

- ASH, L.R.; e ORIEHL, T.C. A Guide to Laboratory. Procedures and Identificacion. Chicago (Ill): ASC Press, 1991.
- CAMPOS, R; BRIQUES, W; BELDA, M.N; SOUZA, J.M; KATZ, N; SALATA, E; DACAL, A.R.G; DOURADO, H; CASTANHO, R.E.P; GURVITZ, R; ZINGANO, A; PEREIRA, G.J.M; FERRIOLE, F.F; COURA, L.C; FARIA, J.A.S; CIMERMAN, B; SIQUEIRA, J.B.F; PRATA, A: Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil. Rhodia – Grupo Rhône-Poulenc, 1988.
- CHAVES, A; ALCANTARA, O. S. de; CARVALHO, O. S; SANTOS, J. S. dos – Estudo Comparativo dos Métodos Coprológicos de Lutz, Kato – Katz e Faust modificado, São Paulo (SP), Rev. Saúde Públ., 13:348-52, 1979.
- DE CARLI, G.A. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro. Editora Medsi, 1994.
- DE CARLI, G.A. e OLIVEIRA, O.L.M. Controle de Qualidade em Parasitologia Clínica. In: Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. Editora Atheneu, 2001.
- DE CARLI, G.A. Colheita e Preservação da Amostra Fecal. In: Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. Editora Atheneu, 2001.
- GARCIA, L. S. e BRUCKNER, D.A. Diagnostic Medical Parasitology. 3º edição, Washington: ASM Press, 1997.
- HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P. & NEVES, F.A.M.A. - Detecção de Enteroparasitoses em Amostras Fecais Provenientes de Diferentes Localidades do Estado de São Paulo, Utilizando a Técnica de TF-Test. Rio de Janeiro (RJ), Rev. Bras. Anal. Clín., 35(2): 46 B, 2003.
- LIMA, A.O. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica: técnicas e interpretação. 8a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- MARIANO, M. L. M; CARVALHO, S. M. S; MARIANO, A. P. M; ASSUNÇÃO, F. R; CAZORLA, I. M. - Uma nova opção para diagnóstico Parasitológico: Método de Mariano e Carvalho. NewsLab 68 edição, 2005.
- MELVIN, D.M.; e BROOKE, M.M: Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3º edição. HHS publication N° (CDC) 82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.
- NEIMEISTER, R. Introduction. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.1-7.1.11,v.2, 1992.
- NEVES, D.P. – Parasitologia Humana. 10ª edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2000.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica. Livraria Editora Santos. 2ª edição, 1999.
- PRICE, D.L. Procedure Manual for Diagnosis of Intestinal Parasites. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- RDC Nº 302, de 13 de Outubro de 2005 – Dispõe sobre regulamento Técnico para funcionamento de Laboratório Clínicos.
- SOUZA, R.F e AMOR, A.L.M. Controle de Qualidade de Técnicas realizadas nos laboratórios de Parasitologia da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Salvador, Bahia. Anais do 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / 2º Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul / 3º Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, volume 41, página 134, Porto Alegre: Gráfica Editora Pallotti, 2008.
- SOUZA, R.F; SOPHIA, L; RODRIGUES, M; FONSECA, S. Controle de Qualidade Interno dos Laboratórios de Análises Clínicas da Secretaria Municipal de Saúde de Salvador. [Projeto Interdisciplinar do 4º semestre – Período letivo 2005.2] Curso de Farmácia, Faculdade de Tecnologia e Ciências, 2005.
- STEWART, C.E.; e KOEPKE, J.A. Basic Quality Assurance Practices for Clinical Laboratories. New York: Nostrand Reinhold, 1989.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rodrigo Fernandes Souza
Rua Salomão Barros, 28
CEP. 41195-290 Salvador - BA

Efeito de diferentes tipos de exercício físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos no plasma de mulheres após a menopausa

Different exercise approaches on the oxidative stress and biochemical markers of women plasma after menopause

Noler Heyden Flausino; Lorena Rocha Ayres; Stella Maris da Silveira Duarte; Lívia Mara Santos; Maria Fernanda Chiattoni; Poliana de Oliveira & Fernanda Borges de Araújo Paula

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da realização do exercício de força (EF) e de atividades físicas variadas (AFV) sobre parâmetros bioquímicos de rotina, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase de enzimas antioxidantes no plasma de mulheres após a menopausa. A população estudada compreendeu 25 mulheres, com idade entre 55 e 75 anos. Um grupo realizou EF a 50% do índice de repetições máximas e o outro grupo realizou exercícios a 50% da frequência cardíaca máxima, 3 vezes por semana, durante 4 semanas. Os níveis de triglicerídeos diminuíram nos dois grupos. No grupo AFV as concentrações de proteínas totais e de creatinina diminuíram. A peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e a atividade de SOD aumentaram. No grupo EF, as atividades de SOD e de GPx aumentaram. Não houve alteração na peroxidação lipídica e na oxidação protéica. Sugerimos que o protocolo de EF adotado, seria mais indicado para a população idosa, por reduzir os níveis de triglicerídeos e estimular a atividade de enzimas antioxidantes sem alterar os marcadores de estresse oxidativo no plasma.

PALAVRAS-CHAVE - exercício, idoso, estresse oxidativo, qualidade de vida.

SUMMARY - In this sense this work intended to compare two different exercise programs, strenght exercise (EF) and varied physical activities (AFV), on usual biochemical parameters, lipid peroxidation, protein oxidation and activities of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase of women, after their climacteric period. A sample of 25 women (55-75 years old) were divided into two groups. The first group (n=15) carried out EF efforts at 50% of maximum repeats (IRM) while the other group (n=10) executed physical exercises at 50% of maximum heart frequency, three times a week, up to four weeks. Triglyceride plasma levels diminished in both groups. The AFV group presented a reduction in the concentration of total protein and creatinine. Lipoperoxidation, protein oxidation and SOD activity increased after the AFV approach. SOD and GPx activities increased in the EF group, but there was no changes in levels oxidative stress markers. Our results points to the EF protocol better than the AFV one for the elderly people evaluated, as it seems to have reduced triglyceride levels, whereas stimulated antioxidant enzyme activities, and with no changes in oxidative stress markers of the plasma.

KEYWORDS - exercise, aged people, oxidative stress, quality of life.

INTRODUÇÃO

O envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças relacionadas ao envelhecimento tais como, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas tem sido demonstrado por diversos autores⁽¹⁾. A adoção de medidas preventivas em relação a estas doenças pode reduzir a mortalidade e morbidade, principalmente na população idosa⁽²⁾.

Alguns autores têm demonstrado que o treinamento físico pode diminuir o estresse oxidativo e aumentar os níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em diferentes tecidos de animais e também em humanos⁽³⁻⁷⁾. Sabe-se que durante a contração muscular ocorre aumento do metabolismo no músculo esquelético que resulta na produção de espécies oxidantes, como o ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila⁽⁸⁾. Assim muitas células são capazes de responder ao aumento na formação destas espécies oxidantes, induzindo mecanismos de reparo e proteção, levando a adaptação do sistema de defesa antioxidante, para proteger o organismo contra os efeitos deletérios de tais espécies e evitar a lesão celular^(3,4). No entanto, esta resposta do organismo ao exercício físico é altamente dependente de diversos fatores como, o tipo, duração e intensidade do exercício; nível de antioxidantes e

tipo de tecido analisado⁽⁵⁾. Portanto, a identificação do tipo de exercício físico ideal para um determinado grupo de indivíduos, cujas adaptações bioquímicas sejam benéficas à sua saúde pode contribuir não somente para a medicina esportiva como também para a saúde pública, melhorando a qualidade de vida do ser humano. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar as adaptações bioquímicas induzidas por diferentes protocolos de exercício físico, exercício de força e atividades físicas variadas no plasma de mulheres após a menopausa.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística: foram selecionadas 25 mulheres com idade entre 55 e 75 anos integrantes da UNATI (Unifal aberta à terceira idade), residentes em Alfenas-MG. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Alfenas e, antes de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, as participantes foram informadas dos objetivos, procedimentos, possíveis desconfortos, riscos e benefícios do estudo. As participantes foram submetidas a avaliação clínica e apresentaram atestado médico antes de iniciar os protocolos de exercício físico propostos neste estudo. Foi realizada anamnese para avaliação do grau de instrução, estilo de vida e nível de atividade física (IPAQ)⁽⁶⁾. A composição corporal foi avaliada segundo Tran & Weltman⁽⁹⁾.

Recebido em 20/02/2009

Aprovado em 26/02/2010

Universidade Federal de Alfenas - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Alfenas - MG.

Determinação do consumo de oxigênio (VO₂ máx): o teste de VO₂, foi avaliado pelo protocolo de Rockport apud Fenstermarker⁽¹⁰⁾, também conhecido como teste da milha, teste submáximo de campo desenvolvido pelo Rockport Walking Institute⁽¹¹⁾, indicado para pessoas sedentárias e idosos. A verificação da frequência cardíaca e do tempo de execução da caminhada foi realizada logo após o seu término⁽¹²⁾. Junto com o teste de milha, foi aplicada a escala de Borg⁽¹³⁾, que tem como objetivo avaliar os índices de percepção de esforço.

Protocolo de exercício: a população em estudo foi dividida em 2 grupos. O grupo exercício de força (EF) foi composto por 12 mulheres com idade entre 55 e 75, que realizaram exercícios a 50% do índice de reações máximas (IRM), três vezes por semana, durante um período de quatro semanas. O grupo atividades físicas variadas (AFV) foi formado por 13 mulheres com idade entre 55 e 75, que realizaram exercícios a 50% da frequência cardíaca máxima, com duração de 30 minutos, três vezes por semana durante um período de quatro semanas.

Obtenção das amostras: o sangue periférico foi colhido por punção venosa, antes e após a prática do exercício, sendo uma parte da amostra utilizada para obtenção de soro e outra parte colhida com ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para obtenção de plasma.

Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo: a peroxidação lipídica foi estimada através da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁽¹⁴⁾ e a oxidação de proteínas foi avaliada através do conteúdo de grupos carbonil⁽¹⁵⁾, em espectrofotômetro Genesys 10 UV, utilizando reagentes da marca Sigma. A concentração de TBARS foi expressa em Êmol de malonaldeído por g de proteína plasmática.

Determinação dos parâmetros bioquímicos de rotina: a concentração de glicose, colesterol total e frações, ácido úrico, uréia, creatinina, proteínas totais e albumina, assim como a atividade de aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas por métodos colorimétricos⁽¹⁶⁾, utilizando-se espectrofotômetro Genesys 10 UV e reagentes da marca Labtest.

Determinação da atividade das enzimas antioxidantes: As atividades de superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) foram determinadas em espectrofotômetro Genesys 10 UV, utilizando reagentes da marca Sigma, pelos métodos descritos por foi determinada segundo Oyanagui⁽¹⁷⁾, Sinet *et al.*⁽¹⁸⁾ e Machely & Chance⁽¹⁹⁾, respectivamente. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína plasmática.

Análise Estatística: os dados obtidos foram comparados através do teste t de Student ou pelo teste ANOVA one-way, seguidos pelo teste de Tukey quando p < 0,05.

RESULTADOS

Para caracterização da amostra e aplicação do protocolo de exercícios foi realizada a anamnese, avaliação da composição corporal e o teste de VO₂. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos analisados (tabela 1). Na tabela 2, observa-se que os níveis de triglicerídios diminuíram significativamente após a realização dos dois tipos de exercício físico por um período de quatro semanas. No grupo de mulheres que praticaram atividades físicas variadas, os níveis séricos de creatinina, proteínas totais e colesterol VLDL diminuíram quando comparados com os valores obtidos antes de iniciar tais atividades.

A realização de atividades físicas variadas induziu um

aumento nos níveis de TBARS e na concentração de grupos carbonil quando comparados aos níveis obtidos antes da realização destas atividades enquanto que nenhuma alteração significativa foi observada no grupo que praticou exercício de força (figura 1).

Observou-se um aumento na atividade de superóxido dismutase no plasma das mulheres pertencentes aos diferentes grupos estudados. A atividade da enzima glutatona peroxidase foi significativamente maior no grupo que realizou exercício de força quando comparada ao grupo que realizou atividades físicas variadas, porém nenhuma altera-

TABELA I
Características descritivas da população estudada.

Variáveis	Exercício de Força	Atividades Físicas Variadas
	Média ± EPM	Média ± EPM
Altura (cm)	164 ± 1,4	162 ± 1,1
Peso (kg)	63 ± 1,4	62 ± 2,0
Idade (anos)	68 ± 1,5	65 ± 1,6
Composição Corporal (%)	28 ± 0,9	28 ± 0,9

Resultados descritos como média e erro padrão da média (EPM). Comparação pelo teste t de Student.

TABELA II
Efeito do exercício de força e das atividades físicas variadas sobre os parâmetros bioquímicos no soro de mulheres na terceira idade antes e após a realização dos diferentes protocolos de exercícios.

Parâmetros Bioquímicos	Exercício de Força (EF)		Atividades Físicas Variadas (AFV)	
	Inicial (EF1)	Final (EF2)	Inicial (AFV1)	Final (AFV2)
Creatinina (mg/dL)	0,97 ± 0,03	0,78 ± 0,04	1,17 ± 0,08 ^a	0,75 ± 0,09 ^b
Triglicérides (mg/dL)	144 ± 22 ^a	72 ± 13 ^b	178 ± 22 ^a	79 ± 14 ^b
Proteínas totais (g/dL)	6,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1	7,5 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,2 ^b
Albumina (g/dL)	4,1 ± 0,17	3,7 ± 0,07	3,4 ± 0,13	3,4 ± 0,13
Colesterol Total (mg/dL)	176 ± 13	139 ± 20	198 ± 16	222 ± 15
Colesterol HDL (mg/dL)	55 ± 4,1	60 ± 5,6	61 ± 3,1	59 ± 4,0
Colesterol VLDL (mg/dL)	31 ± 7,1	17 ± 4,2	36 ± 4,5 ^a	16 ± 2,7 ^b
Colesterol LDL (mg/dL)	89 ± 12	61 ± 15	104 ± 15	147 ± 11
Glicose (mg/dL)	86 ± 7,7	100 ± 5,8	61 ± 9,4	81 ± 5,1
AST (U/L)	16 ± 2,4	20 ± 2	33 ± 3,8	22,4 ± 2,7
Ac. Úrico (mg/dL)	5,2 ± 0,3	4,2 ± 0,2	5,8 ± 1,0	3,8 ± 0,3

Resultados descritos como média e erro padrão da média (EPM). Comparação pelo teste t de Student (EF1 X EF2 e AFV1 X AFV2). Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a realização do exercício físico (p < 0,05).

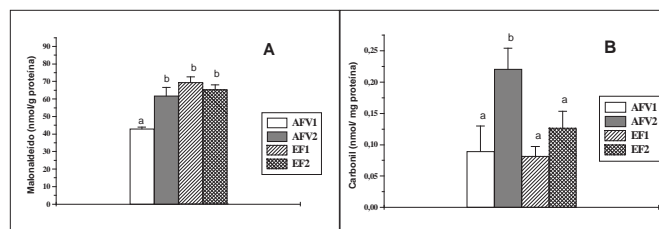


Figura 1: Efeito do exercício de força (EF) e das atividades físicas variadas (AFV) sobre os marcadores de estresse oxidativo no plasma de mulheres após a menopausa, antes (EF1, AVF1)) e após (EF2, AFV2) a prática mesmos. A figura 1A representa a média e o erro padrão da média estimados como concentração de malonaldeído (MDA) para cada grupo estudado. A figura 1B representa a média e o erro padrão da média e o erro padrão da média estimados como grupamento carbonil para cada grupo estudado. Comparação pelo teste t de Student (EF1 X EF2 e AFV1 X AFV2). Letras diferentes em um determinado grupo indicam diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a realização do exercício físico (p < 0,05).

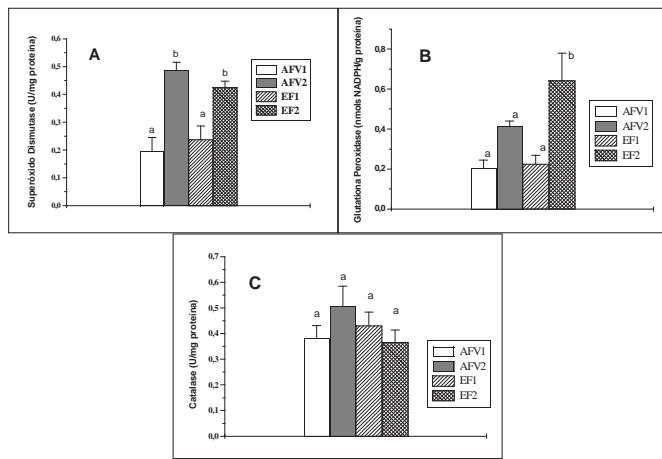


Figura 2: Efeito do exercício de força e das atividades físicas variadas sobre a atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) no plasma de mulheres na terceira idade, antes (EF1, AVF1) e após (EF2, AVF2) a prática mesmos. As figuras 2A, 2B, 2C representam as médias e os erros padrões das médias estimados como atividade de SOD, GPx e CAT para cada grupo estudado. Comparação pelo teste t de Student (EF1 X EF2 e AVF1 X AVF2). Letras diferentes em um determinado grupo indicam diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a realização do exercício físico ($p < 0,05$).

ção significativa foi observada na atividade de catalase quando os dois grupos foram comparados entre si (figura 2).

DISCUSSÃO

O envelhecimento tem sido associado ao aumento do estresse oxidativo, redução na atividade do sistema de defesa antioxidante e à presença de mutações no DNA mitocondrial. A literatura aponta que o exercício regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante, as quais protegem as células contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Assim, o treinamento físico em idosos poderia compensar as diminuições na capacidade antioxidante e o aumento no estresse oxidativo decorrentes do avanço da idade, induzir hipertrofia muscular e reduzir a mortalidade e morbidade nesta população^(20, 21).

Apesar de já terem sido identificadas as possíveis adaptações bioquímicas responsáveis por estes benefícios, a contribuição de cada uma delas sobre a modulação dos eventos celulares relacionados ao processo de envelhecimento, ainda não está totalmente esclarecida. Além disso, sabe-se que a realização de exercício físico acima da intensidade ideal pode conduzir a mudanças significativas na suscetibilidade de macromoléculas ao estresse oxidativo⁽³⁾. Desta forma, o uso de marcadores sanguíneos sensíveis, pode ajudar no estabelecimento de protocolos de exercícios físicos mais adequados à população idosa, objeto de estudo do presente trabalho.

Os achados deste estudo demonstraram que o grupo que realizou atividades físicas variadas foi mais susceptível às alterações bioquímicas, quando comparado ao grupo que realizou o exercício de força. Observamos que a resposta do organismo aos dois protocolos adotados foi benéfica em relação ao perfil lipídico, levando à redução significativa nos níveis séricos de triglicérides, sugerindo assim um efeito anti-aterogênico para ambos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que o exercício físico aumenta o catabolismo de lipídios tais como, colesterol, triglicérides e lipoproteínas, que são consumidos para pro-

dução de energia, diminuindo assim suas concentrações no sangue e músculo⁽²²⁾.

Por outro lado, a realização de atividades físicas variadas induziu aumento nos níveis plasmáticos de TBARS e de grupamentos carbonil além de reduzir a concentração sérica de proteínas e de creatinina em comparação com os níveis basais.

Sabe-se que a realização de exercício físico pode aumentar o catabolismo e a excreção urinária de creatinina e proteínas, favorecendo a redução de seus níveis sanguíneos⁽²²⁾. A deficiência de proteínas pode impedir a síntese de enzimas antioxidantes e reduzir a concentração de antioxidantes não enzimáticos nestes tecidos resultando, portanto em um comprometimento do sistema de defesa antioxidante. Além disso, tem sido sugerido que em indivíduos com deficiência protéica, pode haver um aumento na concentração de ferro livre como resultado de baixas concentrações de suas proteínas transportadoras ou armazenadoras como, transferrina, lactoferrina e ferritina; o que poderia favorecer reações de peroxidação lipídica levando ao estresse oxidativo⁽²³⁾. Desta forma, a redução na concentração das proteínas séricas poderia contribuir o desenvolvimento de um processo de estresse oxidativo, por alterar a atividade do sistema de defesa antioxidante.

As principais enzimas antioxidantes são a SOD (EC. 1.15.1.1), GPx (EC. 1.11.1.9) e catalase (EC 1.11.1.6), que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra espécies reativas de oxigênio geradas *in vivo*. No entanto ainda existem muitas controvérsias quanto aos efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre a atividade destas enzimas^(20, 24, 25). Dados da literatura têm demonstrado que o envelhecimento pode levar à diminuição na atividade de enzimas antioxidantes em diferentes órgãos, enquanto que outros autores têm relatado aumento ou até mesmo nenhuma alteração na atividade enzimática em resposta ao envelhecimento^(24, 25). Apesar dos benefícios induzidos pelo exercício físico sobre a saúde humana, e especialmente em relação à população idosa, os dados obtidos até momento sobre alterações na atividade de enzimas antioxidantes, em resposta à realização de diferentes protocolos de exercício físico ainda são divergentes^(20, 26, 27). No presente trabalho observou-se um aumento na atividade de SOD nos dois grupos estudados, porém a atividade da glutathione peroxidase aumentou apenas após a realização do exercício de força e nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da catalase após a realização dos dois tipos de exercício.

O aumento na atividade e expressão de SOD tem sido observado no músculo esquelético de ratos após a realização de exercício físico^(7, 20). Embora a SOD seja um importante fator de proteção contra o estresse oxidativo, sabe-se que esta enzima é capaz de acelerar a formação de peróxido de hidrogênio. Assim, tem sido sugerido que o aumento de SOD sem um aumento proporcional na atividade de peroxidases, na presença de metais de transição, poderia contribuir para a formação de radical hidroxila, e aumentar o estresse oxidativo^(7, 28). Portanto, para uma defesa efetiva contra o estresse oxidativo é necessário um aumento equilibrado na atividade do sistema de defesa antioxidante e este não pode ser necessariamente fornecido pelo aumento na atividade de uma única enzima.

Sendo assim, as diferenças nas concentrações de TBARS e de grupos carbonil observadas entre os diferentes grupos analisados, poderiam ser atribuídas à resposta do organismo em relação à ativação das enzimas antioxidantes, SOD e GPx.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, concluímos

que os dois tipos de exercício apresentaram efeitos benéficos sobre o perfil lipídico, porém o grupo que realizou atividades físicas variadas demonstrou ser mais susceptível ao estresse oxidativo, enquanto que o grupo que realizou exercício de força apresentou melhores respostas adaptativas. Neste contexto, podemos sugerir que um programa de exercício físico adotando o protocolo de exercício de força descrito neste trabalho, seria mais indicado para a população em estudo quando comparado ao protocolo de atividades físicas variadas, por não aumentar a peroxidação lipídica e estimular a atividade de SOD e GPx concomitantemente, no plasma de mulheres após a menopausa. Vale ressaltar que futuras investigações para avaliar o efeito da realização do protocolo de exercício de força em longo prazo sobre as adaptações bioquímicas são necessárias, não somente para confirmar a eficácia da prescrição deste protocolo, como uma estratégia para proporcionar a manutenção dos níveis TBARS e de grupos carbonil no plasma, mas também para avaliar a contribuição efetiva do papel das peroxidases e de outros antioxidantes plasmáticos na proteção do organismo contra o estresse oxidativo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1- YANG, J.; WEISSM, L.; BORH, V. A.; MATTSON, M. P. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. *DNA repair*, 7: 1110-1120, 2008.
- 2- LEE, I.; PAFFENBERGER, R. S. Associations of light, moderate, and vigorous intensity physical activity with longevity. *Am. J. Epidemiol.*, 151:293-299, 2000.
- 3- GANDRA, P. G.; MACEDO, D. V.; ALVES, A. A. Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício. *Revista Brasileira de Ensino em Bioquímica e Biologia Molecular*, 02(06): c1-c11, 2006.
- 4- SLUPPHANG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, 531: 231-251, 2003.
- 5- LIU, J.; YEO, H. C.; ÖVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S. J.; CHU, D. W. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.*, 89:21-28, 2000.
- 6- PARISE, G.; BROSE, A. N.; TARNOPOLSKY, M. A. Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Exp. Gerontol.*, 40:173-180, 2005;
- 7- RADÁK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 44: 153-159, 2007.
- 8- PARDINI, R.; MATSUDO, S. A. , MATSUDO, V.; ANDRADE, E.; BRAGGION, G.; ANDRADE, D. R. Validação do questionário internacional do nível atividade física (IPAQ-versão 6) Estudo piloto em adultos jovens brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, 9(3):45-51, 2001.
- 9- TRAN, Z. V.; WELTMAN, A. Generalized equation for predicting body density of women from girth measurements. *Med. Sci. Sport Exer.*, 21(1): 4-14, 1989.
- 10- FEENSTERMAKER, K. L.; PLOWMAN, S. A.; LOONEY, M. A. Validation of the Rockport Fitness Walking Test in females 65 years and older. *Res. Q. Exerc. Sport*, 63(3): 322-327, 1992.

11. AMERICAM COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Canadá, 2000. 6nd ed.
- 12- POLLOCK, M.; WILMORE, J. H. Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993, 718 p.
- 13- BORG, G. Escalas de Borg para dor e o esforço percebido. São Paulo: Manole, 2000, 126 p.
- 14- WINTERBOURN, C. C.; GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O2. *Free Radic. Biol. Med.*, 2: 1119-1122. 1981.
- 15- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186: 464-478, 1990.
- 16- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, 1917p.
- 17- OYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, 142: 290-296; 1984.
- 18- SINET, P. M.; MICHELSON, A. M.; BAZIN, A.; LEJEUNE, J.; JEROME, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 910-915; 1975.
- 19- MACHELY, A. C.; CHANCE, B. The assay catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.*, 1: 357-359, 1954.
- 20- PARISE, G.; BROSEA, A. N.; TARNOPOLSKYB, M. A. Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Exp. Gerontol.*, 40: 173-180, 2005.
- 21- JI, L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 44:142-152, 2007.
- 22- LAC, G.; MASO, F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol. Biol.*, 52:43-49, 2004.
- 23- GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.*, 19:1807-1819, 2007.
- 24- HATAO, H.; OH-ISHI, S.; ITOH, M.; LEEUWENBURGH, C.; OHNO, H.; OOKAWARA, T. Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mech. Ageing. Dev.*, 127: 384-390, 2006.
- 25- GÜNDÜZ, F.; SENTÜRK, Ü. K.; KURU, O.; AKTEKIN, B.; AKTEKIN, M. R. The effect of 1 year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol. Res.*, 53:171-176; 2004.
- 26- RAO, G.; XIA, E.; RICHARDSON, A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.*, 53: 49-60, 1990.
- 27- PINHO, R. A.; ANDRADES, M. E.; OLIVEIRA, M. R.; PIROLA, A. C.; ZAGO, M. S.; SILVEIRA, P. C. L. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol. Int.*, 30(10): 848-853, 2006.
- 28- ITOH, M.; OH-ISHI, S.; HATAO, H.; LEEUWENBURGH, C.; SELMAN, C.; OHNO, H. Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm. *Am. J. Physiol.*, 287: R33-R38, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
 Universidade Federal de Alfenas -
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro
 CEP: 37130-000 Alfenas, MG.
 E-mail: fernanda@unifal-mg.edu.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

Níveis de antígeno prostático específico (PSA) em indivíduos com diferentes hábitos alimentares*

Specific prostate antigen levels (PSA) in individuals with different alimentary habits

Valéria Cristina Ribeiro Dantas¹, Ralfo Cavalcante de Medeiros², Luciana Vilar de Sales Rocha³, Ana Angélica de Lacerda Rocha⁴, Laura Lídia Serique Gato Lamarão⁵, Pâmela Danuta Costa Fernandes⁶ & Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino⁷

RESUMO - O câncer de próstata é o segundo mais freqüente em homens no Brasil, sendo superado apenas pelo tumor de pele não melanoma. Estudos têm mostrado que certos hábitos alimentares podem interferir nesta realidade. O tumor de próstata apresenta um crescimento lento, cerca de 15 anos para atingir 1 cm³, acometendo homens principalmente a partir de 65 anos. O diagnóstico é realizado através da quantificação do Antígeno Prostático Específico (PSA) em associação com outros exames: toque retal e ultra-sonografia. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de PSA em indivíduos com diferentes hábitos alimentares e associar estes à incidência elevada de câncer prostático. Após preenchimento de ficha de entrevista, as amostras de soro foram coletadas de 50 pescadores residentes nas Rocas (Natal/RN) e 331 pacientes (grupo controle) do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Potiguar (LACT-UnP). Os níveis de PSA mostraram um aumento significativo nas faixas etárias dos 50-59 e dos 60-69, anos do grupo controle em relação ao grupo de pescadores, podendo este fato ser justificado pelo estilo mais saudável de alimentação consumida pelos pescadores.

PALAVRAS-CHAVE - Antígeno Prostático Específico (PSA). Câncer de próstata. Hábitos alimentares.

SUMMARY - The prostate cancer is as the most frequent one in men in Brazil, being surpassed only for the tumor of not melanoma skin. Studies have shown that certain alimentary habits can intervene with this reality. The prostate tumor presents a slow growth, about 15 years reaching 1 cm³, stricken men mainly from 65 years. The diagnosis is carried through the quantification of prostate-specific antigen (PSA) in association with other examinations: rectal and ultrasonography touch. In this way, the objective of this work was to evaluate the levels of PSA in individuals with different alimentary habits, and to associate these the high incidence of prostate cancer. After fulfilling of interview fiche, the samples of serum had been collected of 50 resident fishing in the Rocas (Natal/RN) and 331 patients (control group) of the Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Potiguar (LACT-UnP). The PSA levels had shown a significant increase in the 50-59 and of the 60-69 years of the control group in relation to the group of fishing, being able this fact to be justified by the style most healthful of feeding consumed for the fishing.

KEYWORDS - Prostate-specific Antigen (PSA). Prostate Cancer. Alimentary habits.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo mais freqüente em homens no Brasil, sendo superado apenas pelo tumor de pele não melanoma. Para 2005, foi estimada a ocorrência de 46.330 casos novos, correspondendo a um risco estimado de 51 casos novos a cada 100 mil homens. Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, levando cerca de 15 anos para atingir 1cm³ e acometendo, principalmente, homens acima de 65 anos (INCA, 2004). O câncer pode ser considerado como um processo multifatorial que envolve uma interação complexa de fatores endógenos e exógenos, a maior parte deles ainda por elucidar (CORRÊA *et al.*, 2003).

Embora a dosagem de PSA aumente a detecção de câncer de próstata, há uma superposição significativa nos valores entre pacientes com hipertrofia benigna e câncer. A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é um distúrbio comum e consiste no crescimento do órgão prostático, resultante da proliferação não neoplásica do estroma e das glândulas prostáticas. O volume hiperplásico provoca diferentes graus de compressão da uretra prostática ou pode funcionar como uma válvula no orifício uretral interno; conseqüentemente, causa retenção urinária, podendo estar associada com sintomas miccionais obstrutivos ou irritativos (HENRY, 1999).

O carcinoma de próstata em fase inicial apresenta-se sob a forma de um nódulo endurecido detectado pelo toque retal; a consistência dura se deve à presença de estroma fibroso abundante. Em alguns casos, o componente fibroso e o nódulo não são endurecidos; com a evolução do tumor; a próstata de aspecto normal é substituída progressivamente pela neoplasia, onde se observa, na superfície do corte histológico, tecido homogêneo e esbranquiçado ou branco-amarelado, pela riqueza das células adiposas contendo lipídeos (HENRY, 1999).

O diagnóstico para este tipo de câncer é realizado através de várias técnicas de triagem, tais como: exame de toque retal, biópsia de tecido prostático, ultra-sonografia e testes laboratoriais, como dosagem da fosfatase ácida prostática e determinação dos níveis séricos de PSA. Como o tecido prostático normal possui grande quantidade da enzima fosfatase ácida, o carcinoma de próstata quase sempre pode ser detectado quimicamente, visto que os adenocarcinomas que surgem da próstata conservam com freqüência a capacidade de produzir esta enzima (RHODEN *et al.*, 2001; JOHNSON; KOTOWSKI, 1993). É de fundamental importância a pesquisa de PSA em homens a partir dos 40 anos na prevenção do câncer prostático.

O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais prostáticas e pelas glândulas periuretais. Sua atividade está relacionada com a função de liquefação do coágulo.

Recebido em 20/04/2009

Aprovado em 19/01/2010

*Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Universidade Potiguar-UnP.

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde-UFRN, Bioquímica do Hospital Universitário Onofre Lopes-UFRN e professora de Imunologia Clínica-UnP.

²Mestre em Ciências Farmacêuticas-UFRN e professor de Hematologia Clínica-UnP.

³Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas-UFRN, professora de Citologia Clínica-UFRN.

^{4,5,6}Acadêmicos do Curso de Farmácia-UnP.

⁷Doutora em Ciências da Saúde-UFRN e professora de Citologia Clínica e do Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas-UFRN.

lo seminal, ao clivar as principais proteínas formadoras de gel em peptídeos, aumentando a mobilidade dos espermatozóides. A meia vida biológica do PSA é de 2,2 dias ou 52,8 horas. É um componente do tecido prostático saudável e do líquido seminal (SAWAYA; ROLIM, 2004; CORRÊA *et al.*, 2003; MALM; LILJA, 1995).

No soro, o PSA pode ser observado sob a forma molecular livre ou ligado a inibidores endógenos de protease, com 70 a 90% do PSA na forma complexada à \cdot 1-antiquimiotripsina (ACT) e uma pequena quantidade complexada à α 1-antitripsina e proteína C. Em torno de 10 a 30% do PSA total no soro circula na forma livre (fPSA); uma porção do PSA está ligada à α 2-macroglobulina, porém não é detectável no soro por não ser imunorreativa, ou seja, seus sítios antigênicos estão envelopados dentro da molécula. Normalmente, o PSA é encontrado no soro em baixas concentrações, exceto quando a estrutura microscópica da próstata é alterada, como, por exemplo, no câncer de próstata, hipertrofia prostática benigna, prostatite aguda e biópsia prostática (RHODEN *et al.*, 2004; ROSSATO; SILVA, 2004).

Foi observado que valores de PSA na faixa de 4 a 25 ng/mL, indicam alguma forma de doença prostática, mas não são definitivos para o diagnóstico de câncer prostático e podem ser causados pela hipertrofia prostática benigna. A probabilidade do carcinoma de próstata com valores de PSA nessa faixa é de aproximadamente 20% a 50%. De qualquer maneira, valores de PSA, de pelo menos 4 ng/mL asseguram uma maior investigação de um provável processo maligno da próstata (CIRIADES; RODRIGUES, 2000; HENRY, 1999). Nos pacientes com biópsia positiva para o câncer prostático, os níveis séricos do PSA não se correlacionam com o estágio de desenvolvimento do câncer; não sendo relacionado ao tamanho do tumor e nem com a extensão da doença, a menos que o tumor tenha quebrado a cápsula prostática, tornando-se metastático. Além disso, tumores indiferenciados nem sempre produzem PSA e podem dar origem a resultados falso-positivos. Por isso, valores séricos baixos de PSA não descartam definitivamente o carcinoma da próstata (RHODEN *et al.*, 2004; HENRY, 1999).

Estudos epidemiológicos variados comparam hábitos alimentares de diferentes populações aos níveis de câncer de próstata. Estes indicaram que uma alimentação gordurosa, sobretudo caracterizada pelo consumo elevado de carne vermelha, favorece o crescimento de tumores prostáticos (ARRUDA *et al.*, 2003).

Outro componente alimentar que parece influenciar o câncer de próstata, desta vez, como um inibidor do crescimento, é a proteína de soja. Ela reduz o nível de testosterona circulante no sangue e inibe também uma enzima que transforma a testosterona em sua mais potente forma nas células prostáticas. Certas evidências indicam que produtos derivados do tomate, vitamina E e o mineral selênio também podem inibir o crescimento de tumores. Outros componentes de diversos alimentos também estão sendo pesquisados como possíveis promotores ou inibidores do câncer de próstata. A necessidade atual é de mais estudos em humanos que avaliem o valor protetor de certas mudanças na alimentação e dos complementos alimentares em homens que correm risco de câncer de próstata (KRISTAL *et al.*, 2006; ORNISH *et al.*, 2005; STROM *et al.*, 2005). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de PSA em um grupo de pescadores da cidade de Natal, de hábitos alimentares saudáveis, frente a um grupo controle, cuja alimentação era considerada diversificada, com a finalidade de analisar a correlação do hábito alimentar e o risco de desenvolver câncer de próstata.

MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada constou de 50 pescadores, entre 20 e 65 anos, com condições sócio-econômicas similares e hábito alimentar saudável, residentes nas Rocas, Natal/RN. O grupo controle foi composto de 331 homens com dieta alimentar sem restrição, com faixas etárias variando de 20 a 65 anos e saudáveis, que procuraram o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Potiguar (LACT-UnP). As coletas foram iniciadas após assinatura do "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" e do preenchimento da ficha de anamnese.

As amostras foram obtidas através de punção de sangue periférico, transferidas para tubos estéreis sem anticoagulante, para obtenção de soro a partir da coagulação do sangue total, à temperatura ambiente e centrifugação por 15 min, 2000 rpm a 26°-27°C. Este soro foi estocado a -20°C até a sua utilização para a dosagem de PSA total.

O princípio do doseamento do PSA total associa o método imunoenzimático *sandwich* em duas etapas com uma detecção final em fluorescência (ELFA-*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), sendo todas as etapas automatizadas (Sistema Mini-Vidas/ bioMérieux), seguindo as recomendações do fabricante.

RESULTADOS

De acordo com a análise da entrevista realizada ao aplicar a ficha de anamnese foi observado que no grupo de 50 pescadores, 50% (25 homens) consumiam peixe frequentemente, 40% (22 homens) ocasionalmente de 1 a 3 vezes por semana e 6% (3 homens) relataram o consumo de peixe raramente (menos de 1 vez por semana). Já o grupo controle (331 homens), todos relataram o consumo de carne frequentemente, e raramente o consumo de peixe.

Analisando os valores de PSA sérico do grupo de pescadores (Tabela 1), podemos observar que os níveis de PSA total foram classificados como PSA de valores normais. Nos grupos de idades inferiores aos 40 anos, observou-se uma frequência de 87% quando foram relacionados com a normalidade, já os demais grupos etários apresentaram uma frequência de 100% com a normalidade.

TABELA I
Níveis de PSA do grupo de 50 pescadores de acordo com a faixa etária.

Faixa Etária (anos)	N	Média (ng/mL)	PSA (ng/mL)	Valores de Referência* (ng/mL)
< 40 Anos	24	0,54	0,8-2,00	0,21-1,72
40-49 Anos	17	0,68	0,09-2,10	0,27-2,19
50-59 Anos	5	0,48	0,30-0,74	0,27-3,42
60-69 Anos	4	0,84	0,14-2,20	0,22-6,16

Fonte: Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UnP, 2005
*Os valores de referência utilizados foram de acordo com o fabricante pelo método fluorimétrico (Sistema Mini-Vidas/bioMérieux).

Os níveis normais de PSA total do grupo composto por 331 homens denominados de grupo controle, encontraram-se dentro dos valores normais (Tabela 2). No grupo de idade inferior aos 40 anos, foi observado uma frequência de 100%, correlacionando com os valores de referência. Nas faixas etárias dos 40 aos 49 anos, 50 aos 59 e dos 60 aos 69 anos, esta frequência foi de 97%, 94% e 95%, respectivamente, correlacionando com os valores de referência. Tabela 2: Níveis de PSA do grupo de 331 homens controle de acordo com a faixa etária.

TABELA II
Níveis de PSA do grupo de 331 homens
controle de acordo com a faixa etária.

Faixa Etária (anos)	N	Média (ng/ml)	PSA (ng/ml)	Valores de Referência* (ng/ml)
< 40 Anos	9	0,62	0,27-1,53	0,21-1,72
40-49 Anos	86	0,88	0,16-13,30	0,27-2,19
50-59 Anos	89	1,61	0,20-45	0,27-3,42
60-69 Anos	58	2,00	0,10-10,94	0,22-6,16

Fonte: Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UnP, 2005
 *Os valores de referência utilizados foram de acordo com o fabricante pelo método fluorimétrico (Sistema Mini-Vidas/bioMérieux).

Analisando os dados obtidos, pode ser observado que os resultados apresentaram os níveis de PSA total do grupo controle mais elevado em todas as idades em relação aos níveis de PSA dos indivíduos pescadores (Figura 1).

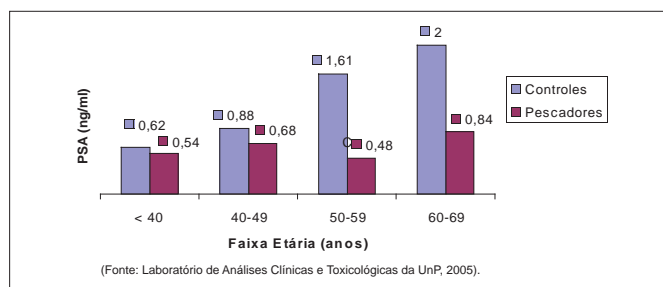


Figura 1: Correlação dos níveis séricos de PSA do grupo de pescadores e do grupo controle de acordo com a faixa etária.

Ao realizar uma comparação entre a frequência dos valores normais frente aos alterados nas diferentes faixas etárias, pode ser observado um aumento significativo dos valores alterados a partir dos 50 anos (6%) nos pacientes com alimentação rica em gordura frente aos valores dos pacientes com alimentação mais saudável.

Discussão

Segundo a observação de Kristal (2006), o risco para câncer de próstata é significativamente maior entre homens com ingestão aumentada de calorias, grande quantidade de gordura e cálcio. O estudo coletou dados de 605 homens com câncer de próstata e de 592 controles, com 40 a 64 anos de idade, onde foram avaliados os riscos associados à ingestão elevada de calorias, gordura, cálcio e vitamina D. Os indivíduos responderam a questionários sobre dieta antes do diagnóstico de câncer de próstata, sendo observado que o consumo de energia total esteve associado a um risco elevado de câncer de próstata. Os achados deste estudo mostraram também que a ingestão de dietas com alto teor de gordura e cálcio aumentam o risco de estágios mais avançados da doença, provavelmente porque a dieta diminui a progressão do câncer de próstata em casos mais agressivos. Por outro lado, Ornish *et al.* (2005) e Strom *et al.* (2005), demonstraram que uma dieta hipolipídica suplementada com fibras pareceu reduzir o crescimento das células cancerosas. Dieta com apenas 20% das calorias totais provenientes de gordura e 30 g/dia de fibras reduziu significativamente as concentrações totais de testosterona, androgênio livre e colesterol. Além disso, homens com uma pontuação na escala de Gleason menor ou igual a 6, antes de iniciar a dieta, mostraram uma tendência a menores níveis de PSA. O câncer de próstata é o mais detectado nos americanos; em 1998, mais de 184.500 homens apresentaram este tipo

de câncer e 39.200 morreram por causa da doença, ficando como a segunda mais importante causa de morte por câncer em homens, seguido da incidência de câncer de pulmão (KRISTAL *et al.*, 2006; RHODEN *et al.*, 2004).

Este tipo de câncer acomete principalmente homens com idade acima de 40 anos, onde sua maior causa pode ser devido a vários fatores genéticos ou predisponentes, como: consumo elevado de carne vermelha, que possui alto teor de gorduras, fumo, álcool, entre outros (INCA, 2004).

Neste trabalho, os soros foram obtidos de um grupo de pescadores face aos seus hábitos alimentares, por terem uma dieta rica em carne de peixe. O consumo e os hábitos alimentares foram avaliados através de questionário.

A relação das médias obtidas das 381 amostras, grupos de pescadores e controles revelaram que os níveis de PSA do grupo controle estão mais elevados em todos os grupos de idades em relação aos níveis de PSA dos pescadores. Quando foram relatados os valores de PSA mínimos e valores máximos, o grupo controle obteve os valores mais elevados chegando a 45,0 ng/mL, enquanto no grupo dos pescadores o valor máximo chegou a 2,20 ng/mL.

A frequência da dieta alimentar pelo grupo controle mostra um aumento significativo nas médias dos níveis de PSA, nas idades compreendidas de 50 aos 59 anos (6%) e dos 60 aos 69 anos (5%), em relação aos pescadores que tiveram sua dieta baseada no consumo de carne de peixe, mostrando resultados condizentes com a literatura (ARRUDA *et al.*, 2003).

O grupo de pescadores, com idade inferior aos 40 anos, apresentou as médias dos níveis de PSA superior ao controle. Talvez isso se deva ao fato de que homens jovens sejam mais resistentes a hábitos saudáveis na alimentação, bem como ao estilo de vida e atividade sexual, refletindo estes fatores nos níveis de PSA.

Diante dos dados analisados, pode-se observar que, ao correlacionar os níveis de PSA sérico com os hábitos alimentares, os níveis de PSA se elevaram com uma ingestão maior de gordura. Uma educação alimentar como medida preventiva é importante para reduzir os casos de câncer de próstata. Logo, a orientação verbal e as medidas preventivas de aconselhamento são importantes para reduzir os casos de câncer ou o surgimento de seqüelas no futuro.

Porém, a relação dos hábitos alimentares e uma maior frequência de câncer de próstata ainda necessitam de estudos mais aprofundados, que forneçam maior evidência desta associação, já que não estão fundamentados e comprovados esta relação.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, H. O.; VIEIRA FILHO, J. P. B.; ORTIZ, V.; SROUGI, M. PSA e medidas antropométricas em índios da Amazônia: avaliação da comunidade Parkateiê. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 5, p. 624-628, 2003.
- CIRIADES, P.G.J.; RODRIGUES, W. R. F. A.. Valores de referência do PSA-Antígeno Prostático Específico calculado para idades ano a ano a partir de 2.848 dosagens efetuadas na população do laboratório Rhesus. *Revista Laes & Haes*. São Paulo: 126. ed., 2000.
- CORRÊA, N. A. B.; COSTA, G. F. M.; MASSAMBANI, E. M.; MATUMOTO, F. H.; PAULA, M. M.M. Diagnóstico precoce de carcinoma de próstata: Antígeno Prostático Específico (PSA)—um marcador quase ideal. *Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)*. Rio de Janeiro: v. 35, n. 2, p. 63-64, 2003.
- HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999.
- INCA, M. *Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil*, Rio de Janeiro. INCA, 2004.
- JOHNSON, E. D.; KOTOWSKI, T. M. Detection of prostate specific antigen by ELISA. *Journal of Forensic Sciences*, v. 38, n. 2, p. 250-258, 1993.

KRISTAL, A. R.; CHI, C.; TANGEN, C. M.; GOODMAN, P. J.; ETZIONI, R.; THOMPSON, I. M. Associations of demographic and lifestyle characteristic with prostate-specific antigen (PSA) concentration and rate of PSA increase. *Cancer*, v. 106, n. 2, p. 320-328, 2006.

MALM, J.; LILJA, H. Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, v. 221, p. 15-22, 1995.

ORNISH, D.; WEIDNER, G.; FAIR, W.; MARLIN, R.; PETTENGILL, E.; RAISIN, C.; DUNN-EMKE, S.; CRUTCHFIELD, L.; JACOBS, F.; BARNARD, R. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. *Journal of Urology*, v. 174, n. 3, p. 1065-1069, 2005.

RHODEN, E. L.; RIBEIRO, E. P.; RIEDNER, C.; TELOKEN, C.; SOUTO, C. A. V. Avaliação do valor de relação do antígeno prostático específico livre e do total no diagnóstico do câncer de próstata. *Revista AMRIGS*. Porto Alegre: v. 48, n. 3, p. 158-161, 2004.

RHODEN, E. L.; RIEDNER C. E.; MAFFESSIONI, R.; GOBBI, D.; TELOKEN, C. SOUTO, C. A. V. . Free to total prostatic specific antigen ratio for the diagnosis of prostate cancer. *Brazilian Journal of Urology*, v. 27, n. 5, p. 454-460, 2001.

ROSSATO, E. R.; SILVA, A. S. Avaliação comparativa dos testes de PSA Total, PSA livre/total, PSA complexo e PSA complexo/PSA total no diagnóstico do câncer de Próstata. *Revista Newslab*. [S.l.], Ano XII, n. 62, 2004.

SAWAYA, M. C. T.; ROLIM, M. R. S. Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: aplicação forense. *Visão Acadêmica*. Curitiba, v. 5, n. 2, p. 109-116, 2004.

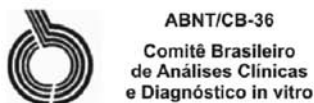
STROM, S. S.; WANG, X.; PETTAWAY, C. LOGOTHETIS, C.; YAMAMURA, Y.; BABAIN, R.; DO, K.; TRANCOSO, T. Obesity, weight gain, and risk of biochemical failure among prostate cancer patients following prostatectomy. *Clin Cancer Res*, v. 11, n. 19.1, p. 6889-6894, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Ana Conceição Ribeiro D. Saturnino
Av. Bernardo Vieira, 4114/404
CEP. 59051-005 Natal - RN



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

Determinação sérica de lipídeos: variações interlaboratoriais

Determination serica of lipids: variations interlaboratoriais

Elaine Cristina Cabral¹, Glausiani Erbs da Costa¹, Edneia Casagrande Bueno²,
Juliana Bernardon Pretto Gonçalves³ & Darlene Camati Persuhn⁴

RESUMO - A aterosclerose encontra-se em primeiro lugar dentre as várias causas de morte no mundo ocidental; distribuída em todo mundo, ela vem alcançando proporções epidêmicas alarmantes. A determinação laboratorial das concentrações de triglicerídeos, colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C) e LDL-colesterol (LDL-C) é pré-requisito importante na avaliação do risco que um indivíduo apresenta de desenvolver doenças relacionadas à aterosclerose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade interlaboratorial na determinação destes analitos. Para isso, foram enviados aos laboratórios de análise clínicas (LACs) participantes do estudo 10 amostras de soro de origem humana, para determinação de triglicerídeos, CT, HDL-C e LDL-C. A metodologia foi planejada a fim de eliminar variáveis pré-analíticas, permitindo assim quantificar a variação da mesma determinação entre os LACs participantes. A determinação de CT foi a que apresentou a menor dispersão de resultados, sendo este dado evidenciado pela inexpressiva quantidade de valores fora da linha de $\pm 2SD$. A análise de dispersão de HDL-C mostrou que 50% dos indivíduos analisados receberia resultados com interpretações clínicas diferentes por diferentes LACs. Esta porcentagem foi de 40% no LDL-C e de 40% para triglicerídeos. Os resultados obtidos permitem concluir que a variabilidade laboratorial na determinação de lipídeos pode ser um fator importante na interpretação de resultados sequenciais.

PALAVRAS-CHAVE - Laboratório Clínico, Lipídeos, Variabilidade Interlaboratorial.

SUMMARY - The atherosclerosis is in first place, among the several death causes in the western world, distributed in everybody she is reaching alarming epidemic proportions. The determination laboratorial of the triglycerides concentrations, total cholesterol (CT), HDL-cholesterol (HDL-C) and LDL-cholesterol (LDL-C) it is important pre-requirement in the evaluation of the risk that an individual presents of developing diseases related to the atherosclerosis. The objective of this work was to evaluate the variability interlaboratorial in the determination of these analitos. For that, they were correspondents to the laboratories of analysis clinics (LACs) participants of the study 10 samples of serum of human origin for triglycerides determination, CT, HDL-C and LDL-C. The samples were obtained starting from individuals previously selected, using as criterion of inclusion values of lipids dosage previously obtained. The methodology was drifted in order to eliminate pre-analytic variables, allowing like this to quantify the variation of the same determination among participant LACs. The determination of CT was the one that it presented the smallest dispersion of results being this die evidenced out by the inexpressive amount of values of the line of $\pm 2SD$. The analysis of dispersion of HDL-C showed that 50% of the analyzed individuals would receive results with different clinical interpretations for different LACs. This percentage was of 40% in LDL-C and of 40% for triglycerides. The obtained results allow concluding that the choice of the laboratory of clinical analyses may be an important aspect in sequential lipids determination results.

KEYWORDS - Clinic Laboratory, Lipids, variability interlaboratorial.

INTRODUÇÃO

A doença artério-coronariana permanece como a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo industrializado. A doença progride silenciosa e lentamente por décadas, levando a sérias manifestações clínicas na forma de infarto do miocárdio ou morte súbita. Por este motivo, os fatores de risco para estas doenças são amplamente investigados. Juntamente com fatores clínicos, vários marcadores laboratoriais são alvos de análise: entretanto, somente 5 testes fazem parte da prática clínica de rotina: CT, LDL-C, HDL-C, triglicerídeos e colesterol não-HDL (RIFAI; WARNICK, 2004).

Segundo o Programa Nacional dos EUA para a Educação sobre o colesterol, é necessário classificar apropriadamente os pacientes segundo níveis e estratégias de tratamento e que, para isso, torna-se imprescindível medições exatas dos componentes do perfil lipídico (WARNICK *et al.*, 2002). Os exames realizados pelos LACs passam por três fases distintas antes da liberação do resultado final. A Norma Brasileira (NBR)14500:2000 define como processo pré-analítico as etapas que se iniciam em ordem cronológica a par-

tir da solicitação do clínico, (e que incluem a requisição do exame e orientação sobre coleta, a preparação e coleta do material do paciente), o transporte e o cadastramento. O processo analítico é o conjunto de operações, usadas na realização de exames de acordo com o determinado método. Finalmente, o processo pós-analítico são as etapas que têm início após execução do exame e que incluem análise de consistência dos resultados, consultoria técnica, liberação de laudos, armazenamento de material ou amostra do paciente, transmissão e arquivo de resultados.

Existe uma grande tendência no LAC de controlar os fatores relacionados à fase analítica das determinações laboratoriais, embora a maior parte dos erros detectados em estudos específicos demonstre que as fases mais críticas no que tange ao erro são a pré-analítica e a pós-analítica (BONINI *et al.*, 2002). O controle da qualidade, em qualquer setor produtivo, é o conjunto de técnicas e atividades operacionais que são usadas para cumprir pré-requisitos da qualidade. No LAC, utiliza-se basicamente dois tipos de controle da qualidade: interno e externo. O controle interno da qualidade consiste nos procedimentos conduzidos em associação com o exame das amostras dos pacientes, para avaliar se o siste-

Recebido em 09/10/2008

Aprovado em 14/01/2010

NiqFar - Núcleo de Investigação Químico-Farmacêutica - Curso de Farmácia - UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
Projeto financiado pelo Artigo 170/SC - UNIVALI.

¹Acadêmicas do Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí.

²Professora PhD dos Cursos de Farmácia e Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

³Professora MSc. do Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí.

⁴Professora Dra. dos Cursos de Farmácia e Medicina da Universidade do Vale do Itajaí.

ma analítico está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos. O controle externo da qualidade refere-se à determinação do desempenho dos exames clínicos através de comparações interlaboratoriais (ABNT, 2000).

O controle da qualidade intralaboratorial avalia a precisão dos ensaios e deve ser uma avaliação diária, fazendo parte da rotina do LAC. Por outro lado, o controle da qualidade interlaboratorial faz parte da avaliação externa e, normalmente, é realizada periodicamente a fim de avaliar exatidão dos resultados (BURTIS; ASHWOOD, 2001)

Alguns autores vêm realizando trabalhos no sentido de esclarecer a magnitude das variações interlaboratoriais na determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos (PICHETH *et al.*, 2001; HAUSER *et al.*, 2004), assim como suas implicações na interpretação dos resultados que são emitidos nos laudos laboratoriais.

Picheth e colaboradores (2001) avaliaram a determinação sérica de glicose em 36 LACs da Região Sul do Brasil. Os autores utilizaram como amostra soluções de glicose em concentrações de decisão clínica. Apenas 14 LACs (38,8% do total) atingiram a performance desejada nas três amostras do estudo; a pesquisa preconizou que a maioria dos participantes (cerca de 60%) dos LACs necessita aprimorar os procedimentos de Controle da Qualidade objetivando eficiência analítica e relevância clínica dos resultados.

Por outro lado, quando se avaliou a variabilidade nos resultados de parâmetros hematimétricos em 14 LACs de Curitiba e Região Metropolitana em relação aos equipamentos utilizados e o emprego de Programas Interno e Externo da Qualidade, observou-se que a maioria dos LACs apresentou resultados hematimétricos entre os limites superiores e inferiores de controle. Houve menor ocorrência de erros para os LACs que realizavam controle externo e interno da qualidade. Os resultados indicaram que a população de Curitiba está sendo bem atendida quando se refere à determinação de valores hematimétricos e tais resultados incentivam os LACs à utilização de programas de controle da qualidade em laboratório (HAUSER *et al.*, 2004). Tendo em vista todos estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação interlaboratorial na determinação sérica de lipídeos num município do Vale do Itajaí.

MATERIAL E MÉTODOS

População e amostra

Participaram do estudo 8 LACs, todos sediados no mesmo município, totalizando 100% dos LACs do local.

Coleta de amostras biológicas

O sangue obtido, a partir de indivíduos previamente convidados a participar do estudo, foi coletado por punção venosa, utilizando seringa plástica de 10 mL. Após 30 minutos de repouso, completada a coagulação sanguínea, o soro foi separado através de centrifugação (3.000rpm por 15 minutos). Alíquotas de 200 microlitros foram separadas em tubos plásticos com tampa, mantidos sob refrigeração em isopor e encaminhados aos LACs participantes.

As amostras de soro de origem humana, foram enviadas aos LACs sempre no mesmo dia e horário. Não foram definidos critérios de inclusão ou exclusão para pacientes tendo em vista que o foco do trabalho era a variabilidade dos resultados dos LACs. As amostras dos pacientes serviram somente como ferramenta para a coleta destes dados.

Coleta de dados

Cada LAC participante recebeu 10 amostras de soro obtidas conforme o procedimento acima indicado. Cabe salientar que cada amostra incluída no projeto foi analisada no mesmo

dia por todos os laboratórios e que as mesmas chegaram aos LACs sempre antes de 9:30h e haviam sido coletadas e processadas imediatamente antes da distribuição. Estes cuidados permitiram excluir do estudo as variáveis pré-analíticas.

Análise dos dados

Os resultados de cada paciente foram analisados individualmente, sendo obtidas médias, desvio padrão e coeficiente de variação para os dados. Posteriormente, os mesmos foram plotados em gráficos contendo os valores de referência para determinação de lipídeos como intervalos de comparação. Estas análises permitiram concluir se houve diferença na interpretação dos resultados dos pacientes quanto ao risco de aterosclerose dependendo do LAC onde a análise foi realizada.

Aspectos éticos

Este projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI.

Tanto os LACs quanto os pacientes doadores das amostras foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e convidados a aderir ao projeto através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os resultados foram devolvidos aos LACs na forma de relatório e aos pacientes na forma de laudo não identificado, para que os LACs desconhecem as identidades dos pacientes e vice-versa.

Os LACs participantes não foram informados da identidade dos demais, garantindo assim, sigilo absoluto.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para cada um dos pacientes pelos LACs participantes foram plotados em gráficos de dispersão. Analisou-se também cada determinação individualmente em cada paciente. Para isso, a tabela 1 mostra os valores máximos e mínimos fornecidos como resultado para cada amostra distribuída e o LAC que realizou a análise. Através desta avaliação, foi possível determinar a moda estatística correspondente aos LACs mais incidentes em resultados extremos em todos os parâmetros submetidos a análise.

A partir dos resultados de todos os LACs para cada determinação de cada paciente, excluindo-se os valores extremos, calculou-se a média e desvio padrão (SD). Foi possível, a partir destes dados, encaixar os resultados de cada LAC nos intervalos $\pm 1SD$, $\pm 2SD$ ou maior ou igual $\pm 3SD$ (tabelas 2-5).

TABELA I
Valores mínimos e máximos, e moda estatística para cada participante do estudo.

Participante	colesterol total			triglicerídeos			HDL - colesterol			LDL - colesterol		
	valor máx.	lab.	valor mín.	lab.	valor máx.	lab.	valor mín.	lab.	valor máx.	lab.	valor mín.	lab.
1	310	7	222	3	670	5	359	3	93	5	28	4
2	183	2	165	6	110	3	70	5	89	5	40	4
3	230	7	207	3	475	5	300	4	63	5	26	4
4	158	2	145	4	118	5	40	2	80	5	52	3
5	269	2	239	3/6	191,1	1	137	4	88	5	50	3
6	300,6	5	244	3	195	8	113	6	82	1	53	4
7	227,8	5	186	8	119	8	85	6	63	3	44	4
8	187	7	161	4/6	114	8	41,8	5	68,3	1	45	5
9	255	7	209,3	5	203	8	113,8	5	50	1	26	4
10	156,3	5	130	4	184	8	110	6	49	3	27	4
Moda		7		3		8		5,6		5		4

TABELA II
Dispersão dos resultados de Colesterol Total de cada laboratório em relação a média dos participantes

Laboratórios	Média ± 1 SD	Média ± 2 SD	Média ± 3 SD
1	10	0	0
2	6	4	0
3	5	4	1
4	8	2	0
5	7	3	0
6	7	3	0
7	6	3	1
8	8	2	0

TABELA III
Dispersão dos resultados de HDL colesterol de cada laboratório em relação a média dos participantes

Laboratórios	Média ± 1 SD	Média ± 2 SD	Média ± 3 SD
1	2	7	1
2	10	0	0
3	5	4	1
4	1	3	6
5	3	3	4
6	10	0	0
7	9	1	0
8	9	1	0

TABELA IV
Dispersão dos resultados de triglicerídeos de cada laboratório em relação a média dos participantes

Laboratórios	Média ± 1 SD	Média ± 2 SD	Média ± 3 SD
1	6	3	1
2	8	2	0
3	5	4	1
4	5	5	0
5	2	2	6
6	5	4	1
7	10	0	0
8	4	3	3

TABELA V
Dispersão dos resultados de LDL Colesterol de cada laboratório em relação a média dos participantes

Laboratórios	Média ± 1 SD	Média ± 2 SD	Média ± 3 SD
1	8	2	0
2	7	3	0
3	6	2	2
4	6	4	0
5	2	4	4
6	7	3	0
7	7	1	2
8	6	3	1

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar a variação dos resultados que compõem o perfil lipídico, muito utilizado para avaliar o risco que um indivíduo tem de apresentar problemas vasculares, entre diferentes LACs de um mesmo município. A metodologia foi planejada a fim de eliminar variáveis pré-analíticas, permitindo assim quantificar a variação da mesma determinação entre os LACs participantes. Por se tratar da mesma amostra, o esperado seria coletar resultados muito semelhantes entre os diferentes LACs, para todas as determinações ou, no mínimo, a mesma interpretação clínica para todas elas.

A determinação de CT foi a que apresentou a menor dispersão de resultados, sendo este dado evidenciado pela inexpressiva quantidade de valores fora da linha de $\pm 2SD$ (tabela 2). Este resultado era de certa forma esperado, pois CT é a determinação que exibe menor CV. O conceito de CV é a variação que ocorre entre determinações sucessivas no mesmo LAC utilizando a mesma metodologia. Trata-se de uma variação prevista em qualquer método analítico e deve ser considerada para efeito de interpretação.

A análise de dispersão de HDL-C mostra que 50% dos indivíduos analisados receberia resultados com interpretações clínicas diferentes em diferentes LACs. Observa-se que em alguns casos o distanciamento entre o valor máximo e o mínimo obtidos para a mesma amostra chega a 3 vezes (tabela 1). O mesmo paciente (1) recebeu resultados de 90 mg/dL e 28 mg/dL. Destacam-se os LACs 4 e 5 com

respectivamente 60% e 40% das determinações em valores situados em $\pm 3SD$ (tabela 3). São os mesmos LACs que apareceram com o maior número de valores máximos (LAC 5) e valores mínimos (LAC 4) de HDL-C (tabela 1). O erro total aceito pela literatura para o HDL-C é de 13% (MARANHÃO, 2001; SBC, 2007). Sendo assim, os resultados apontam para a necessidade de revisão dos critérios de qualidade no que diz respeito à determinação de HDL-C, assim como intensificar esforços no sentido de controlar os resultados por programas externos.

O laboratório 5 aparece como o que apresenta, também, o maior número de resultados máximos e mínimos de LDL-C (tabela 1). Estes resultados foram conflitantes com os demais (LACs), estando com 40% das determinações na faixa de $\pm 3SD$ (tabela 4). Este mesmo LAC mostra-se pouco exato quanto a determinação de triglicerídeos, apresentando 60% dos resultados na faixa de $\pm 3SD$ (tabela 5). Os demais LACs destacaram-se por apresentar a maioria absoluta dos resultados dentro da faixa de $\pm 2SD$.

Em laboratórios bem padronizados a variabilidade analítica de LDL-C situa-se entre 2,7 a 6,8%, podendo chegar a 12% em LACs de rotina (RIFAI; WARNICK, 2004). Nos pacientes 1 e 6 a variação entre os LACs chegou a 500% e 30% respectivamente, o que denota que pelo menos alguns deles apresentam variabilidade analítica bem acima do desejado.

O método utilizado para determinação do LDL-C em consensos médicos internacionais é o cálculo através da fórmula de Friedwald, que inclui os valores de CT, HDL-C e triglicerídeos e que compila as variabilidades analítica e biológica de todos os demais. Isso explica a elevada diferença encontrada entre os valores deste analito. A fim de contornar estes problemas, alguns LACs estão usando ensaios homogêneos para a avaliação direta deste analito. Os métodos homogêneos para LDL-C são altamente precisos e representam uma melhoria na medida deste marcador na presença de alta concentração de triglicerídeos. Entretanto, assuntos relativos ao desempenho em amostras de pacientes, não obtiveram sucesso; assim, o efeito destes métodos na classificação precisa de pacientes em categorias de risco necessita de estudos adicionais (RIFAI; WARNICK, 2004).

A análise dos triglicerídeos demonstra que para 40% das amostras avaliadas, dependendo do LAC que realizou a determinação, a interpretação clínica é completamente diferente, podendo situar-se desde normal até acima do limite máximo (tabela 1). Observa-se que o laboratório 5 apresenta 60% das determinações acima de $\pm 3SD$ (tabela 5). Este resultado está de acordo com a elevada discordância do laboratório 5 com os demais quanto ao LDL-C cujo cálculo depende também do resultado de triglicerídeos (tabela 4).

Estes resultados demonstram que existe imprecisão na determinação interlaboratorial de lipídeos, o que torna válida a orientação da Sociedade Brasileira de Cardiologia de realizar determinações seriadas no mesmo LAC (SBC, 2001; SBC, 2007). Existe uma tendência clara de alguns LACs em obter resultados mais elevados e outros mais baixos (tabela 1). No caso de LDL-C, o mesmo LAC evidencia-se em ambos os casos, denotando imprecisão nos resultados e um "bias" elevado.

Um adequado controle interno e externo da qualidade tende a reduzir a amplitude da variação interlaboratorial, uma vez que permite ao LAC a clara comparação do seu resultado com valores-alvo. Estas análises deverão servir como norteadores que orientam o administrador acerca das melhorias necessárias em busca da qualidade.

CONCLUSÕES

Embora o número de amostras analisados tenha sido pequena, os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir que a variabilidade interlaboratorial na determinação de lipídeos mostrou-se relevante para a interpretação clínica dos resultados.

SUPORTE FINANCEIRO

Artigo 170/SC – UNIVALI.

REFERÊNCIAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR14500:2000 – Gestão da qualidade no laboratório clínico. Rio de Janeiro, 2000.
2. BONINI, P.; PLEBANI, M.; CERIOTTI, F.; RUBBOLI, F. Erros em laboratório clínico. *Clinical Chemistry*, Rio de Janeiro, v.48, n.5, p.691-698, jun. 2002. Disponível em: <http://www.pncq.org.br/participantes/atualizacao_baixo_008.asp>. Acesso em: 13 set. 2005.
3. BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. Tietz. Fundamentos de química clínica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
4. HAUSER, A., LEONART, M. S. S., NASCIMENTO, A. J., PROCHASKA, C. L. Programa de Controle de Qualidade externo em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e Região Metropolitana, PR. *Revista Bras Análises Clínicas*. 2004; 36(4):155-8.
5. MARANHÃO, R. C. Metabolismo lipídico: III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. São Paulo, v. 77, p. 9-10, 2001.

6. PICHETH, G. FADEL-PICHETH, C. M. T., YOKOO, A. A., REGO, F. G. M., COSTA, C. D., MELO, S. F. Controle de qualidade da glicemia: um estudo interlaboratorial. *Revista Bras de Análises Clínicas*. 2001, 33(4): 171-4.
7. RIFAI, N., WARNICK, G. Quality specifications and the assessment of the biochemical risk of atherosclerosis. *Clinical Chimica Acta*. Boston, v.1, n.346, p.55-64, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. Acesso em 13 de mar. de 2007.
8. 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*. São Paulo; 2001.
9. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. São Paulo; 2007.
10. WARNICK, G. R.; MYERS, G. L.; COOPER, G. R.; RIFAI, N. Impact of the third cholesterol report from the adult treatment panel of the national cholesterol education program on the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*. Rio de Janeiro, v. 48, n.1, p. 07-11, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. Acesso em: 10 de maio de 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Darlene Camati Persuhn
Rua Uruguai, 458
CEP: 88302-202 Caixa Postal 360 Itajaí-SC
e-mail: darlene@univali.br
Fax: (047)33417678
Fone: (047) 33417804

Acreditação de Sistema de Qualidade de Laboratórios Clínicos e de Organizações Prestadoras de Serviços de Saúde.



DICQ



Instituição Acreditadora da



O mais completo organismo de acreditação de laboratórios clínicos da América Latina

Saiba mais. Acesse: www.dicq.org.br ou entre em contato conosco pelo telefone 21 2187-0822 acreditacao@dicq.org.br e acreditacaodicqona@dicq.org.br

Análise dos polimorfismos *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* em pacientes portadores de diabetes melito tipo 1 no Vale do Sinos *

Analysis of the *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* polymorphisms in type 1 diabetes mellitus brazilian patients

Priscila T Azambuja¹; Sabrina E M Almeida²; Daiane D Berlese² & Regina B Barcelos³

RESUMO - O diabetes melito do tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune de caráter multifatorial. Dentre os fatores genéticos envolvidos no seu desencadeamento, os genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) são responsáveis por 40% do componente genético desta doença crônica. Este trabalho analisou a frequência dos polimorfismos *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* em pacientes diabéticos do tipo 1 residentes na região do Vale do Sinos (RS-Brasil) através da técnica da reação em cadeia da polimerase e de sondas específicas. Como resultado, verificou-se que a frequência destes polimorfismos era mais elevada em pacientes quando comparada com um grupo controle, dado muito semelhante àqueles descritos na literatura. Enfim, a análise das frequências é de extrema importância para o entendimento da etiologia do DM1, contribuindo assim para o diagnóstico precoce e auxiliando no controle e no acompanhamento eficaz dos pacientes acometidos por esta patologia.

PALAVRAS-CHAVE - Diabetes Mellitus tipo 1, predisposição genética, complexo principal de histocompatibilidade, reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY - The type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is a multifactorial autoimmune disease. The human leukocyte antigen system (HLA) genes are one of the genetic factors involved and it is responsible to 40% of the genetic marker of this chronic disease. This paper analyzed the frequency of *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* polymorphisms in type 1 diabetic Brazilian patients using the polymerase chain reaction and specific primers. We found that the frequency of these polymorphisms was bigger in patients than in controls and this data is very similar to those described in literature. At last, the analysis of the polymorphisms is very important to the DM1 etiology, thus contributing to better diagnosis and efficient control of the diabetic patients.

KEYWORDS - Type 1 Diabetes Mellitus, genetic predisposition, major histocompatibility complex, polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

O diabetes melito do tipo 1 (DM1) é uma doença crônica que resulta do ataque auto-imune órgão-específico. Quando os linfócitos T auto-reativos destroem as células beta pancreáticas, ocorre a absoluta deficiência da produção de insulina. Os principais auto-anticorpos encontrados no soro dos pacientes são: antiinsulina (IAA), antiilhotas pancreáticas (ICA), anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e anti-tirosina fosfatase (IA2). Os primeiros sintomas percebidos pelos diabéticos, como polifagia, poliúria, perda de peso e cetoacidose, ocorrem quando as Ilhotas de Langherans já perderam 80% da sua atividade. Em longo prazo, a hiperglicemia ocasiona complicações microvasculares comprometendo principalmente os rins, a retina e os sistemas nervoso e circulatório (20, 12, 3).

No mundo estima-se que haja 18 milhões de portadores de DM1 atualmente, sendo que 60.000 casos novos são diagnosticados ao ano (1). Dentre a população brasileira, acredita-se que 500 mil pessoas são acometidas pelo DM1 (19). Já no Rio Grande do Sul (RS) existem cerca de 15 mil indivíduos atingidos pela doença e destes, 800 encontram-se na região do Vale do Sinos (5).

O RS foi colonizado por diferentes etnias, como alemães, italianos, portugueses espanhóis entre outros. Sendo assim, a população nesta região é de origem caucasiana (13).

A reação auto-imune no DM1 é decorrente de uma associação entre fatores ambientais e genéticos. As infecções virais, o estresse psicológico e a alimentação são exemplos de como o ambiente contribui no desencadeamento do processo inflamatório contra as células beta do pâncreas. Cerca de 64% dos pacientes diabéticos do tipo 1 possuem anticorpos contra os vírus da coxsackie B4, herpes, rubéola ou caxumba (21).

A associação entre os genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA), localizado na região cromossômica 6p21, e o DM1 tem sido exaustivamente estudada, representando cerca de 40% do componente genético desta doença (2). Porém o exato mecanismo que dispara a cascata de eventos que provoca a carência da produção de insulina ainda não está bem estabelecido. Os genes do HLA de classe II (loci DR, DP e DQ) codificam moléculas presentes na superfície das células que atuam na resposta imune. Conseqüentemente, são os marcadores genéticos de doenças endócrinas auto-imunes mais estudados (1, 2). Aly e cols. (3) demonstraram que a presença de um ácido aspártico (Asp) na posição 57 da cadeia beta da proteína, determinada pelo polimorfismo *HLA-DQB1*0602*, seria um fator protetor quanto ao desenvolvimento de DM1. Por outro lado, as variantes non-Asp-57, como *HLA-DQB1*0201* e *DQB1*0302*, são considerados alelos de susceptibilidade por estarem associados a predisposição do DM1.

Em caucasianos, os haplótipos *DR3/DQB1*0201* e *DR4/DQB1*0302* estão presentes em 90% dos pacientes diabéticos do tipo 1, porém a frequência destes polimorfismos varia conforme a região geográfica da população estudada (12). Trabalhos realizados na Europa, Estados Unidos e China encontraram valores que variam entre 47-85% para *DQB1*0201* e de 6-90% para o alelo *DQB1*0302* em pacientes diabéticos do tipo 1 (8, 15). No Estado de São Paulo (Brasil), Volpini e cols. (23) observaram que os indivíduos que apresentavam o polimorfismo *DQB1*0201* tinham 2,3 mais chance de desenvolver o DM1 e aqueles que possuíam o alelo *DQB1*0302* o risco aumentava 4,9 vezes. Fernandes e cols. (10) também verificaram que o risco relativo do desenvolvimento desta patologia era elevado na presença dos alelos *DQB1*0201* (4,45) e

Recebido em 09/10/2008

Aprovado em 08/02/2010

*Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS (Brasil)

*DQB1*0302* (4,49). Estudos brasileiros que relacionam a frequência destes polimorfismos são raros, como o de Bompeixe (4), em Curitiba, que verificou que pacientes portadores de DM1 tinham frequências de 13% e 22% para os alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*, respectivamente.

A etiologia do DM1 poderá ser melhor elucidada através da investigação de genes de susceptibilidade para esta doença. Os alelos que apresentam maior frequência em uma determinada população podem contribuir para a compreensão dos fatores que influenciam o aparecimento das doenças. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as frequências dos polimorfismos *DQB1*0201/DQB1*0302* em portadores de DM1 e em indivíduos com níveis normais de glicose (17) e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2), residentes na região do Vale do Sinos (RS-Brasil), e a sua possível correlação com o desenvolvimento desta patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 82 voluntários caucasianos (28 homens e 54 mulheres), residentes na região do Vale do Sinos (RS- Brasil), com idade entre 18-57 anos, sendo 36 portadores de DM1 previamente diagnosticados e com anti-GAD positivo e 46 indivíduos com níveis normais de glicose e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2), segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (17). O grupo controle apresentou média de idade similar e distribuição entre gêneros equivalente ao grupo de pacientes portadores de DM1. Os voluntários foram selecionados junto ao Laboratório de Biomedicina do Centro Universitário Feevale, a partir de um questionário de triagem. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale no dia 23/11/2007 sob o nº 2.02.03.07.801 e, em seguida, foi autorizado pelos participantes através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi desenvolvido durante o período de julho de 2007 a junho de 2008.

Tipagem de DNA

As amostras foram centrifugadas para separar o plasma da camada de leucócitos e o ácido desoxirribonucléico (DNA) foi extraído pela técnica de *salting-out* (14). Para a tipificação dos alelos *DQB1*0201/DQB1*0302* foi utilizada a técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Para a amplificação foi usada uma reação de volume final de 50 µL, contendo os seguintes reagentes: água (DNA e RNA free), tampão (10 mM tris, 50 mM de KCl), 50 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 15 µmol/µL de cada um de *primers sense* e *anti-sense* (F: 5'-GATTCGTGTACCA GTTTAAGG-3' e R: 5'-CTCGTAGTTGTGTCTGGACAC-3'). A amplificação foi realizada durante 30 ciclos de 94°C por 3 minutos, 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto 72°C por 2 minutos e de extensão final a 72°C por 5 minutos (18). Os produtos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com 3 µL solução de brometo de etídio e visualizadas após exposição à luz ultravioleta, através de um transluminador. Os produtos de PCR gerados possuíam 237pb, os quais foram identificados a partir da posição e do tamanho das bandas visualizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 100pb.

Hibridização com Sondas

Microplacas (Amino Link) foram sensibilizadas com sondas

aminadas específicas (*DQB1*0201*: 5'-GCTGGGGCTGCCTG-3' e *DQB1*0302*: 5'-GGCCGCCTG CCGCCGAG-3') as quais ficaram a 4°C por 24h. Os produtos amplificados foram desnaturados a 100°C por 5 minutos e, em seguida, 10 µL de cada amostra foi aplicado nas microplacas para permitir a ligação do DNA. Posteriormente, as microplacas foram incubadas no forno de hibridização a 50°C por 1 hora. As microplacas foram submetidas a quatro etapas de lavagem e à adição do conjugado de estreptavidina peroxidase e de tetrametil benzidina (TMB). Após 20 minutos, foi adicionado 100µL de ácido sulfúrico a 0,1M. Para determinar a curva de calibração dos produtos de hibridização, as microplacas foram lidas em leitora de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) no comprimento de onda 450nm com refiltro no comprimento de onda de 620nm (18).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico SPSS v.13.0. Foram realizadas análises de frequências dos dados qualitativos, bem como aplicação do chi quadrado (χ^2) para detectar diferenças significativas. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Indivíduos portadores de DM1 tiveram uma frequência de 44,4 % para o alelo *DQB1*0201* e de 52,7% para o alelo *DQB1*0302*. Já os indivíduos com níveis normais de glicose e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2) apresentaram uma frequência de 34,8 % para o alelo *DQB1*0201* e de 36,9% para o alelo *DQB1*0302*. Não foi encontrada uma diferença significativa entre as frequências dos polimorfismos *DQB1*0201/DQB1*0302* do grupo de diabéticos e do grupo controle (Tabela 1).

Dentre o grupo de pacientes, 44,4% apresentavam ambos os *DQB1*0201-DQB1*0302*, ou seja, 100% os portadores do alelo *DQB1*0201* também possuíam o alelo *DQB1*0302*. Por outro lado, 32,6% do grupo controle possuía os dois alelos concomitantemente (Tabela 2). Também foi verificado que 43,8% dos pacientes que possuíam os dois alelos apresentavam a doença há mais de 10 anos.

TABELA I
Frequência de portadores dos alelos *HLA-DQB1* em pacientes portadores de DM1 e grupo controle.

Alelos DQB1	Pacientes (%) (N = 36)	Controle (%) (N = 46)	Valor p**
*0201	44,4	34,8	0,49
*0302	52,8	37,0	0,18

**Valor p calculado a partir do teste do chi quadrado (χ^2).

TABELA II
Frequência da combinação alélica dos alelos *DQB1*0201-DQB1*0302* em pacientes portadores de DM1 e grupo controle.

Combinação	Pacientes (%) (N = 36)	Controle (%) (N = 46)	Valor p**
*0201 -*0302	44,4	32,6	0,35
Outros***	52,8	67,4	

** Valor p calculado a partir do teste do chi quadrado (χ^2).

*** Outros significa qualquer haplótipo excluindo *DQB1*0201 -*0302*.

DISCUSSÃO

A etiologia do DM1 está bem estabelecida, porém o mecanismo que desencadeia a reação auto-imune ainda não foi elucidado. Além disso, a prevalência de DM 1 não diagnosticada continua sendo muito alta apesar das variadas campanhas de prevenção. Assim, é importante identificar indivíduos suscetíveis antes do aparecimento das complicações crônicas (7).

A associação entre os genes do HLA de classe II e a predisposição para o desenvolvimento de doenças auto-imunes tem sido extensivamente estudada. Estes genes são altamente polimórficos, ou seja, populações distintas irão apresentar frequências alélicas diferentes (9). Alguns polimorfismos parecem estar correlacionados com uma maior predisposição genética de desenvolver o DM 1. O Brasil é um país que possui uma miscigenação bastante marcante, porém a população do estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por uma origem basicamente caucasóide (13). Em um estudo brasileiro com indivíduos caucasóides, observou-se que cerca de 90% dos pacientes portadores de DM 1 apresentam os alelos *DQB1*0101-DQB1*0201-DQB1*0302* (11).

O presente estudo revelou uma frequência de 44,4 % para o alelo *DQB1*0201* e de 52,7% para o alelo *DQB1*0302* em indivíduos portadores de DM1. Bompeixe (4), em Curitiba (PR-Brasil), verificou que pacientes portadores de DM 1 tinham frequências de 13% e 22% para os alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*, respectivamente. Contudo frequências similares ao nosso estudo foram encontradas em um trabalho realizado por Mimbacas e cols (15) que analisaram os polimorfismos do gene *HLA-DQB1* em 72 pacientes com DM 1 em Montevidéu (Uruguai), onde 47% deles possuíam o alelo *DQB1*0201* e 35% o alelo *DQB1*0302*. Em adição, Deja e cols (6), em Katowice (Polônia), observaram que dentre os pacientes diabéticos do tipo 1 (n=44), 37% tinham o alelo *DQB1*0201* e 33% o alelo *DQB1*0302*. Cabe ressaltar que estas populações são principalmente formadas por indivíduos caucasóides.

As frequências dos pacientes com DM1 e do grupo controle encontradas neste trabalho não são diferentes significativamente. Em Ribeirão Preto (SP-Brasil), Nahas (16) também não observou uma diferença significativa entre os pacientes portadores de DM 1 e o grupo controle para as frequências dos alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*. Porém, Bompeixe (4), em Curitiba (PR-Brasil), notou que os pacientes e os indivíduos do grupo controle apresentavam frequências estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). Contudo, verificamos que as frequências dos pacientes e do grupo controle são diferentes ainda que não tenham apresentado uma significância estatística. Talvez, o número amostral tenha influenciado neste resultado, não permitindo a detecção de uma real diferença entre as frequências. Assim, futuras pesquisas nesta população que analisem um maior número de indivíduos podem gerar dados mais conclusivos. Além disso, a avaliação da frequência alélica do gene *DQB1* em diferentes regiões geográficas do país poderá contribuir para o melhor entendimento dos fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do DM1.

CONCLUSÕES

A pesquisa de novas técnicas para o diagnóstico precoce, juntamente com a determinação dos fatores de risco são imprescindíveis para a evolução das ciências médicas, pois quando se conhece a causa da patologia o controle pode ser realizado com maior eficácia. As complicações do DM estão intimamente associadas ao desenvolvimento de

doenças cardiovasculares, aumentando a morbidade da população mundial. Desta forma, profissionais da área da saúde capacitados e atualizados podem trabalhar em conjunto a fim de realizar o diagnóstico precoce, minimizando a morbidade destes pacientes e contribuindo assim para a redução dos custos do sistema de saúde público (22).

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários que participaram deste projeto e ao Centro Universitário Feevale pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B. P. - Associação do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. Rev. Baia. Sau. Pub., 29 (1): 105-20, 2005.
2. ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B. P.; LEMAIRE, D. - Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com diabetes tipo 1. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 50 (3): 436-44, 2006.
3. Theresa A. Aly, Mohamed M. Jahromi, Jennifer M. Barker, Maria S. Fernado, Sunanda R. Babu, Liping Yu, Dongmei Miao, Henry A. Erlich, Pamela R. Fain, Katherine J. Barriga, Jill M. Norris, Marian J. Rewers, and George S. Eisenbarth - Extreme genetic risk for type 1 diabetes. PNAS.; 103 (38): 14074-9, 2006.
4. BOMPEIXE, E. P. - Polimorfismos de *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* e abortamento espontâneo recorrente. 2006. 127p. Tese de Doutorado em Genética - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal Paraná, Curitiba.
5. DATASUS - banco de dados do Ministério da Saúde. Brasília. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acesso em: 13 mai. 2008.
6. DEJA, G.; CHOBOT, P. J.; TENDERA, E. M.; POLANSKA, J.; SIEKIERA, U. - Is the association between TNF- α -308 A allele and DMT1 independent of HLA-DRB1, DQB1 alleles? Mediat. Inflamm., 48: 1-7, 2006.
7. DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT). The effect of intensive treatment of Diabetes on the development na progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med., 329 (14): 977-86, 1993.
8. DORMAN, J.; PORTE, R. E.; STONE, R. A.; TRUCCO, M. - Worldwide differences in the incidence of type 1 diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ, chain. PNAS, 87: 7370-4, 1990.
9. EMERY, L. M.; BABU, S.; NORRIS, J. M.; REWERS, M.; EISENBARTH, G. S.; BUGAWAN, T. L. & AL - Newborn HLA-DR, DQ genotype screening: age and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. Pediat. Diab., 6: (3): 136-44, 2006.
10. FERNANDES, A. P. M.; LOUZADA, J. P.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. - HLA-DRB1, -DQB1, and -DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. Ann. NY. Acad. Sci., 958: 305-8, 2002.
11. FERNANDES, A. P.; PACE, A. E.; ZANETTI, M. L.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. - Fatores Imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. Ver. Lat-Amer. Enferm., 13 (5): 743-9, 2005.
12. GILLESPIE, K. - Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. Can. Med. Assoc. J., 175 (2): 165-70, 2006.
13. GRIJO, L. A.; KUHN, F.; GUAZELLI, C. A. B.; NEUMANN, E. S. - Capítulos de história no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2004, 398p.
14. LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. JR. - A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucl. Acid. Res., 19 (19): 5444, 1991.
15. MIMBACAS, A.; BRAVO, F. P.; HIDALGO, P. C.; CARDOSO, H.; GALLINO, J. P.; JAVIEL, G. & et AL - Diabetes type 1 and DQB1 alleles in Uruguay. Gene. Mol. Res., 2 (1): 29-35, 2003.
16. NAHAS, R.; DEGHAIDE, N. H. S.; DONADI, E. A.; FOSS, M. C. - Frequency of HLA class II -DR and -DQ antigens in Brazilian patients with type I diabetes. Medic., 33: 37-41, 2000.
17. OMS, galeria virtual da organização Mundial da saúde. Genebra. Disponível

em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Acesso em: 25 mai. 2008.

18. SANTOS, J.; BRAVO, F. P.; PETRI, R.; ALBALA, C.; CARRASCO, E.; CALVILLAN, M. - Associations between HLA-DQB1 high-risk alleles and type 1 diabetes do not depend on cytomegalovirus antibody status at onset: A case-parent study conducted in Chile. *Imm. Cell. Biol.*, 78: 259-63, 2000.
19. SBD - galeria virtual da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/diabetes/exames/exarotina.php>. Acesso em: 5 mai. 2008.
20. SILVA, M. E. R.; MORY, D. & DAVINI, E. - Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 52 (2): 166-80, 2008.
21. TANNUS, L. R. M.; OLIVEIRA, D. S.; MATHEUS, A. S. M.; CUNHA, E. F.; GOMES, M. B. - Diabete Mellito tipo 1 em gêmeos dizigóticos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 1 (1): 142-5, 2007.

22. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS 33) Group. - Intensive blood-glucose control with sulphonylureas as insulin compared with conventional treatment and risk of complications patients with type 2 diabetes. *Lancet.*, 352: 837-5, 1998.
23. VOLPINI, W. M. G.; TESTA, G. V.; MARQUES, S. B. D.; ALVES, L. I.; SILVA, M. E. R. & et al - Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum. Immunol.*, 62: 1226-33, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Priscila Tondo Azambuja
Rua Feijó Junior 1100, apto. 401
CEP. 95034-160 Caxias do Sul - RS
E-mail: pribio@feevale.br



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

Microbiota fúngica do solo e ar atmosférico na região da Borborema, estado da Paraíba, Brasil*

Fungal microbiota from the soil and atmospheric air in the region of Borborema, Paraíba state, Brazil*

Fillipe de Oliveira Pereira¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², Kelly Rejane Leite de Figueiredo³,
Lizandro Leite Brito³ & Assuero Silva Meira²

RESUMO - O solo e o ar atmosférico constituem o grande habitat fúngico, sendo considerados as principais fontes de infecções dos mesmos. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivos isolar, quantificar e identificar espécies do solo e do ar atmosférico na região da Borborema-Paraíba. Foram coletadas quarenta e quatro amostras em diferentes pontos da região. No solo, foram feitas suspensões das amostras e inoculadas 0,1mL do sobrenadante na superfície de meios de cultura. Para amostras do ar, foi utilizada a técnica de exposição de placas de Petri com meio de cultura. Os fungos predominantes no ar atmosférico foram: *Penicillium* sp. (21,07%), fungos não esporulados (FNE) (17,74%) e *Aspergillus niger* (10,54%). E no solo: *Aspergillus flavus* (21,92%), *Acremonium* sp (21,50%) e FNE (14,85%). Neste estudo, foi observado que os fungos isolados podem causar infecções em variáveis níveis de complexidade, ocupando lugar de destaque entre as doenças tropicais.

PALAVRAS-CHAVE - fungos, ar atmosférico, solo, Borborema, Paraíba

SUMMARY - Soil and atmospheric air are the main fungal habitat, they are the principal infection source of them. Thus, this work had as objectives isolate, count and identify fungi species from the soil and the atmospheric air in the region of Borborema-Paraíba. Forty-four samples were obtained from different places of this region. From the soil samples, some suspensions were produced and put 0,1mL on the surface of the culture medium. From the atmospheric air samples, we used the technique of exhibition Petri's plates with culture medium. The predominant isolated fungi from atmospheric air were: *Penicillium* sp.(21,07%), no sporulating fungi (NSF) (17,74%) and *Aspergillus niger* (10,54%). And on the soil: *Aspergillus flavus* (21,92%), *Acremonium* spp (21,50%) e NSF (14,85%). According to this study, it was noticed that the isolated fungi could cause infections in much complexity levels, occupying a prominence place among tropical diseases.

KEYWORDS - fungi, atmospheric air, soil, Borborema, Paraíba

INTRODUÇÃO

A Paraíba é um estado relativamente pequeno, estando localizado na porção oriental do Nordeste do Brasil, onde ocupa uma área de 56.341 Km². Apresenta clima quente e úmido no interior do Estado, caracterizando-se como equatorial, pois a temperatura anual é superior a 25°C. O Estado da Paraíba está dividido em três regiões geológicas, levando em consideração o limite do litoral para o interior do Estado, assim definidas: Região Atlântica, Região da Borborema e Região do Sertão (15, 18, 23).

"A região da Borborema encontra-se situada no centro do Estado, formando uma faixa diagonal, localizada entre os meridianos 34° 45' e 18° 45' de longitude Oeste e entre os paralelos de 6° 20' 12" e 8° 19' 18" de longitude Sul. As temperaturas médias anuais estão entre 25 a 27°C; a insolação média é 2.800horas/ ano; a umidade relativa do ar é cerca de 50%, caracterizando-se como clima semi-árido quente e seco (15).

Nas extensas áreas das regiões tropicais e equatoriais, prevalece com ou sem caráter de exclusividade um conjunto de doenças, sendo parte delas endêmicas, as quais estão condicionadas a agentes etiológicos ou, então, dependem de mecanismos de transmissão intimamente relacionados a determinadas condições bioclimáticas do meio ambiente tropical. Assim, nas regiões tropicais em todo mundo, por fatores geográficos ligados a outros, ocorre com maior prevalência um conjunto de doenças infecciosas e parasitárias que são enquadradas e denominadas de patologia geográfica tropical (1,12).

Dessa forma, os processos infecciosos causados por microorganismos, em especial, por espécies de fungos, são muitos freqüentes em nosso país, pois em algumas regiões, como Norte, Centro Oeste e Nordeste possuem um clima tropical. Por essa razão, é produzida uma grande variedade de doenças tropicais com quadros clínicos bem diversificados, o que vem fazendo com que a micologia tenha adquirido um importante papel na área médica. A maior parte das patologias fúngicas é diagnosticada mundialmente e seus agentes etiológicos podem ser isolados do meio ambiente em geral. Os fungos podem produzir infecção na pele, pêlos, pêlos, unhas, mucosas, tecido subcutâneo, órgãos e sistemas, ocupando lugar de destaque dentro do panorama das doenças tropicais (1, 5, 20, 25).

Os fungos possuem grande importância ecológica e econômica e são considerados os de compositores primários em todos os ecossistemas terrestres, formam importantes associações com plantas vasculares (micorrizas), constituem a grande maioria dos patógenos para as plantas, oferecem sistemas genéticos apropriados para os biólogos moleculares e são por demais importantes para a biotecnologia (22). Assim, o solo e o ar atmosférico constituem o grande habitat dos fungos, sendo considerados as principais fontes de infecções ou reservatórios dos mesmos. Nos últimos anos têm sido detectadas com importância crescente, diversas doenças oriundas de microorganismos do meio ambiente (5, 12, 2, 25). Os fungos de meio ambiente, geralmente não são patogênicos, mas atuam como patógenos oportunistas. Estão incluídos também, os processos alérgicos adquiridos através da inalação dos esporos. É importante salientar que,

Recebido em 09/10/2008
Aprovado em 02/02/2010

*Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

¹Mestrando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, bolsista CNPq/Universidade Federal de Paraíba.

²Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Ciências farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

³Bolsista PIBIC/CNPq/Universidade Federal da Paraíba.

Apoio financeiro: CNPq/Brasil

nessas situações, esses microrganismos podem desempenhar de fato o papel de agentes primários em processos infecciosos fúngicos, muitas vezes com conseqüências fatais para o indivíduo (8, 25).

Os estudos sobre a ocorrência de fungos ambientais, geralmente considerados oportunistas e contaminantes, são importantes para prevenção e tratamento das patologias que afetam o homem, animais e plantas. E também, poderá permitir avanços no diagnóstico e desenvolvimento de novos métodos de abordagem nessas patologias (6, 26).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba. Foram coletadas quatro (04) amostras constituídas de material do solo e do ar atmosférico em diferentes pontos de cada cidade, no período de novembro/2006 a janeiro/2007. Essas pertencem geograficamente às microregiões da mesorregião Borborema-PB, assim distribuídas: microregião do Cariri Ocidental nas cidades de Monteiro, Serra Branca, Sumé e Taperoá; microregião do Cariri Oriental nas cidades de São João do Cariri, Gurjão e Parari; microregião do Seridó Ocidental nas cidades de São Mamede e Junco do Seridó; microregião do Seridó Oriental nas cidades de Juazeirinho e Pedra Lavrada.

A identificação dos fungos filamentosos, tanto oriundos do solo como do ar atmosférico, foi feita através do estudo da micromorfologia das colônias onde foram observadas suas estruturas vegetativas e reprodutivas e/ou outras características. E no caso dos fungos leveduriformes, além do estudo da macro e micromorfologia, foram utilizadas as provas de comportamento bioquímico como zimograma, auxanograma, urease e outros (12, 13, 7, 9, 10).

Metodologia

• Isolamento e Identificação de Fungos do Solo

Foram coletadas amostras de terra com, aproximadamente, 300 g de solo em quatro pontos de cada cidade determinada, sendo as mesmas foram acondicionadas em recipientes estéreis. Para o isolamento dos fungos, foi suspenso 1g de solo em 10 mL de água destilada em tubo de ensaio estéril. Agitou-se por 10 minutos em Aparelho Vortex (FANEM) para desprender as estruturas de propagação dos fungos. Todo o sistema permaneceu em repouso por 15 minutos para sedimentação. Em seguida, foi inoculado 0,1mL do sobrenadante em placas de Petri de 9 x 100 mm, descartáveis, contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose - ASD (Difco Laboratories Ltda.), adicionado de cloranfenicol a 100mg/mL. O ensaio foi incubado a temperatura ambiente (28-30°C), durante 7-14 dias para a identificação das espécies fúngicas (4, 12).

• Isolamento e Identificação de Fungos do Atmosférico

A coleta dos fungos do ar atmosférico (anemófilos) foi feita através da exposição de placas de Petri contendo ASD, para deposição de esporos ou outras estruturas fúngicas presentes no ar (8, 12). As placas foram abertas nos pontos e horários pré-determinados, durante 15 a 20 minutos. Logo após, as placas foram fechadas, identificadas e incubadas à temperatura ambiente.

RESULTADOS

Os resultados apresentados referem-se às coletas do período de novembro/2006 a janeiro/2007 do solo e ar atmosférico

da mesorregião da Borborema. Foram feitas 4 coletas de amostras do solo e 4 exposições de placas de Petri para coletas de amostras do ar atmosférico em cada município em estudo, totalizando 44 coletas. Foram desenvolvidas 541 colônias de fungos oriundos do ar atmosférico (tabela 2) e 707 colônias do solo (tabela 1) em toda região da Borborema. As suas freqüências foram calculadas em relação ao total de colônias encontradas nas placas.

Nesse estudo, foram detectados e identificados 14 gêneros fúngicos no solo e 19 no ar atmosférico. Entre eles, apenas os fungos não esporulados (FNE) e o gênero *Penicillium* foram identificados no ar de todos os municípios em estudo; ocorrência não observada no solo, onde houve um domínio de certos gêneros.

A partir dos dados registrados na tabela 1, confirmam-se como fungos mais freqüentes: *Penicillium* sp. (21,07%), de FNE (17,74%) e *A. niger* (10,54%) entre as colônias provenientes do ar atmosférico da Borborema. E no solo: *A. flavus* (21,92%), *Acremonium* sp. (21,50%) e de FNE (14,85%) da mesma região. Cerca de cinco gêneros de fungos no ar (*Syncephalastrum* sp., *Paecilomyces* sp., *Geotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp.) e 8 no solo (*Chaetomium* sp., *Mucor* sp., *Sapedorium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Scopulariopsis* sp., *Phoma* sp., *M. sitophila*, *Paecilomyces* sp.) tiveram uma taxa de detecção baixa, inferior a 1% ou 2%.

TABELA I
Distribuição da freqüência de colônias fúngicas isoladas de amostras do solo da mesorregião da Borborema-PB.

Fungos	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
<i>Acremonium</i> sp.	152	21,50
<i>Aspergillus flavus</i>	155	21,92
<i>Aspergillus niger</i>	68	9,62
<i>Aspergillus terreus</i>	32	4,53
<i>Aspergillus ochraceos</i>	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	14	1,98
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	13	1,84
FNE	105	14,85
<i>Fusarium</i> sp.	15	2,12
<i>Geotrichum</i> sp.	12	1,70
<i>Mucor</i> sp.	21	2,97
<i>M. sitophila</i> sp.	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	7	0,99
<i>Penicillium</i> sp.	40	5,66
<i>Phoma</i> sp.	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	18	2,55
<i>Rhodotorula</i> sp.	22	3,11
<i>Sapedorium</i> sp.	-	-
<i>Symphalastrum</i> sp.	3	0,42
<i>Scopulariopsis</i> sp.	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	30	4,24
Total	707	100

-: fungos não detectados nas amostras.

TABELA II
Distribuição da frequência de colônias fúngicas
isoladas de amostras do ar atmosférico da
mesorregião da Borborema-PB.

Fungos	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Acremonium</i> sp.	45	8,32
<i>Aspergillus flavus</i>	55	10,17
<i>Aspergillus niger</i>	57	10,54
<i>Aspergillus terreus</i>	13	2,40
<i>Aspergillus ochraceus</i>	15	2,77
<i>Cladosporium</i> sp.	28	5,18
<i>Chaetomium</i> sp.	2	0,37
<i>Curvularia</i> sp.	29	5,36
FNE	96	17,74
<i>Fusarium</i> sp.	21	3,88
<i>Geotrichum</i> sp.	6	1,11
<i>Mucor</i> sp.	2	0,37
<i>M. sitophila</i> sp.	3	0,55
<i>Paecilomyces</i> sp.	4	0,74
<i>Penicillium</i> sp.	114	21,07
<i>Phoma</i> sp.	3	0,55
<i>Rhizopus</i> sp.	9	1,66
<i>Rhodotorula</i> sp.	27	4,99
<i>Sapedorium</i> sp.	2	0,37
<i>Symphalastrum</i> sp.	2	0,37
<i>Scopulariopsis</i> sp.	2	0,37
<i>Sporobolomyces</i> sp.	6	1,11
Total	541	100

-: fungos não detectados nas amostras.

DISCUSSÃO

Os fungos provenientes do meio ambiente são chamados de contaminantes, são sapróbios vivendo à custa da degradação da matéria orgânica no solo ou como comensais em outros indivíduos sem causar danos evidentes, e produzem grande quantidade de estruturas reprodutivas que, por sua vez, são veiculados por correntes aéreas com extrema facilidade. A grande maioria desses fungos não apresenta uma virulência clássica, ou seja, não são patogênicos, mas atuam como patógenos oportunistas (8, 24).

Na literatura nacional, muitos dos dados em torno de fungos de meio ambiente coletados no Brasil são originados do Sul e Sudeste do país, onde as condições climáticas são bastante divergentes das do Nordeste. Por causa disto, torna-se difícil fazer comparações entre os gêneros fúngicos comuns encontrados em diferentes regiões, ou até mesmo de regiões bem próximas.

Por exemplo, PURCHIO (20) observaram a predominância de *Cladosporium* sp. no ar atmosférico da Baixada santista durante os meses frios. Este gênero foi comum em Natal-RN nas estações secas do ano em estudos feitos por OLIVEIRA (18), não sendo observado essa alta taxa em nossos resultados. MEZZARI (16) em estudos feitos sobre fungos anemófilos da cidade de Porto Alegre, relatam uma larga incidência entre

novembro e janeiro de espécies de *Penicillium* sp.e *Aspergillus* sp. Tais gêneros também foram encontrados nesse trabalho, nesse mesmo período. Em geral, as espécies fúngicas de grande incidência identificadas nesse estudo são também àqueles muito frequentemente relatados em outros trabalhos qualitativos em diversas cidades brasileiras (15, 16). A população microbiana do ar é transitória e variável, visto que o mesmo não é um meio no qual possam crescer os microrganismos, mas é um portador de poeiras e gotículas que pode estar carregadas de microrganismos. Na literatura médica, têm sido um fato conhecido e divulgado as infecções causadas por fungos anemófilos. Em geral, são alergias respiratórias, infecções cutâneas, gastrintestinais, pulmonares, cardiopatias (19, 20).

O gênero *Penicillium* sp. foi o de maior incidência no ar atmosférico, de acordo com os dados da tabela 2. É um gênero que pode ser encontrado sobre todos os tipos de substrato, podendo alcançar elevadas concentrações atmosféricas de seus conídios. Clinicamente estão envolvidos em casos de ceratites, otites, sinusites, infecções urinárias, pulmonares, quadros alérgicos, micotoxicoses e diversos quadros de hialo-hifomicoses (8, 24).

Em geral, os fungos do solo possuem a propriedade de decompor substâncias celulósicas colonizando os vegetais, suas raízes e resíduos, adquirindo importante função na reciclagem de nutrientes. O conhecimento da microbiota do solo é fundamental para levantamento taxonômico das populações fúngicas podendo chegar ao descobrimento de processos metabólicos por tais microrganismos, tomando-se importantes para as interações ambientais e nas aplicações biotecnológicas (3).

Em regiões de clima tropical, as espécies mais frequentemente encontradas são *A. flavus* e *A. niger*, gêneros bastante freqüentes registrados nesse estudo. O gênero *Aspergillus* sp. é constituído de mais de 200 espécies, tendo sido implicadas como patógenos em potencial no homem e animais, cerca de 20 espécies. Esses fungos são cosmopolitas e extremamente presentes na natureza, sendo encontrados em restos orgânicos, no solo, no ar, em diversos veículos líquidos, sobre a superfície dos seres vivos, etc. Dentre as espécies, *A. flavus* foi o fungo que mais vezes foi detectado nas amostras de solo. É um fungo geralmente contaminante, mas também se sabe que tem poder patogênico em humanos relacionado principalmente a problemas oculares e pulmonares, além de produzir aflatoxinas (8, 24).

CONCLUSÕES

Diante de tudo exposto, os resultados tornam-se preocupantes, visto que muitos desses fungos podem ser patogênicos aos seres humanos, outros animais e plantas, causando infecções de variáveis graus de complexidade conforme foi discutido. Dessa maneira, esse trabalho torna-se importante para prevenção e tratamento das patologias, além de contribuir com o estudo da microbiota fúngica da localidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq (Brasil) pelas bolsas de pesquisa cedidas e expressam seus agradecimentos a todos os profissionais que compõem o Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAM, A. M. L.; GÓMEZ, A. L. B. & ANDREW, C. F. Aislamiento de dermatófitos a partir de niños sin signos clínicos de dermatofitosis. *Rev. Cub. Med. Trop* 38: 147-150, 1986.
2. AJELLO, J. C. Soil as natural reservoir of human pathogenic fungi. *Science* 123: 876-879, 1965.
3. BOULTON, A. M.; JAFFE, B. A. & SOCOW, K. M. Effects of a common harvester ant (Messor Andrei) on richness and abundance of soil biota. *Applied Soil Ecology* 23: 257-265, 2005.
4. GARCIA-QUITANDA, H.; ZAROR, L. C. & LEIVA, P. S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aislados de suelos chilenos. *Rev. Méd. Chile* 125:1157-1164, 1997.
5. GILMAN, J. C. *Manual de los Hongos Del Suelo*. Compañía Editorial Continental, S. A., México, 1969.
6. GRUMACH, A. S. *Alergia e imunologia na infância e na adolescência*. Atheneu, São Paulo, 2001.
7. HOOG, G. S. & GUARRO, J. *Atlas of Clinical Fungi*. Rovira I. Centrabureau von Schimmelcultures, Virgili, 1995.
8. KERN, M. E. & BLEVINS, K. S. *Micologia Médica: Texto e Atlas*. 2. ed. Premier, São Paulo, 1999.
9. KRIGER VAN-RIJ, H. J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3.ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
10. KURTMAN, C.P. & FEEL, J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4. ed. Elsevier, Amsterdam, 1998.
11. LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G. & SIQUEIRA JÚNIOR, W. *Introdução à geografia médica do Brasil*. Ed. USP, São Paulo, 1972.
12. LACAZ, C. S.; PORTO, E. & MARTINS, J. E. C. *Micologia Médica*. 8. ed. Sarvier, São Paulo, 2002.
13. LARONE, D. H. *Medically Important Fungi*. 3. ed. ASM Press, Washington, 1995.
14. MELO, A. S. T. & RODRIGUEZ, J. L. *Paraíba: desenvolvimento econômico e a questão ambiental*. Grafset, João Pessoa, 2003.
15. MENDES, E. & LACAZ, C. S. Fungos anemófilos da cidade de São Paulo. *Rev. Paul. Med.* 41: 270-271, 1952.
16. MEZZARI, A. PERIN, C.; SANTOS JÚNIOR, A. S. & BERND, L. A. G. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Int. Méd. Trop.* 44: 269-272, 2002.
17. MOURA, G.F. *Comportamento Diurno e sazonal de parâmetros fitoplanc-tônicos e hidrológicos no estuário do Rio Paraíba do Norte Estado da Paraíba, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 1992.
18. OLIVEIRA, M. T. B.; BRAZ, R. F. S. & RIBEIRO, M. A. G. Airborne fungi isolated from Natal, state of Rio Grande do Norte – Brazil. *Rev. Microbiol.* 24: 198-202, São Paulo, 1993.
19. PELCZAR JRM, REID R, CHAN ECS. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. V. I e II. Makron Books Ltda, São Paulo, 1980.
20. PURCHIO, A.; GAMBALE, PAULA, C. R. Airborne fungi of Baixada Santista, state of São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol.* 15: 258-265, 1984.
21. RICHARDSON, M.D. & WARNOCK, D. W. *Fungal Infection: diagnosis and management*. Scientific Publication. USA. 1993.
22. RODRIGUEZ, J. L.; TELLES, M. V. V.; LÓBREGA, J. M.; SILVA, J. N. & TRIGUEIRO, O. M. *Cartilha Paraíba: aspectos geo-históricos e folclóricos*. Grafset, João Pessoa, 1991.
23. SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.; TRUFEM, S. F. B.; GRANDI, R. A. P.; MILANEZ, A. I. & PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 61-65, 2001.
24. SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
25. SIDRIM, J. J. C. & ROCHA MFG. *Micologia médica luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
26. TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. & CANDEIAS JAN. *Microbiologia*. 3. ed., São Paulo, Atheneu, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

E-mail: fillipefop@yahoo.com.br



**Programa
Nacional de
Controle de
Qualidade**

PNCQ

Participe!

www.pncq.org.br
pncq@pncq.org.br

Tradição com a Qualidade



(21)2569-6867

Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cérvico-vaginal*

Dimension of the human Papillomavirus (HPV) participation in the cervix-uterine cancer evolution

Márcia Mayumi Ito¹; Simone Maria de Vargas²; Linda Emiko Suzuki³ & Júlio Cezar Merlin⁴

RESUMO - A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) representa um autêntico desafio em termos de saúde pública, pois afeta milhões de indivíduos em todo o mundo. Existem mais de 100 tipos diferentes de HPV e podem ser de baixo e de alto risco para o desenvolvimento do câncer. Os HPV tipos 6 e 11, encontrados na maioria das verrugas genitais e papilomas laríngeos, parece não oferecer nenhum risco de progressão para malignidade. Entretanto, os tipos virais 16, 18, 31, 33, 45, 58, considerados de alto risco, estão associados a lesões pré-cancerígenas e tumores genitais. Para o desenvolvimento do câncer cérvico-uterino, a infecção cervical pelo HPV é considerado o primeiro passo. Duas medidas de prevenção podem ser adotadas: o uso de vacinas profiláticas contra tipos específicos de HPV, e a realização do exame colpocitológico oncocítico (Papanicolaou) de forma preventiva, que de acordo com o Ministério da saúde traz efetividade no diagnóstico precoce das lesões cervicais.

O presente trabalho tem por objetivo descrever a importância da participação do HPV na gênese do câncer cérvico vaginal, os demais fatores envolvidos, bem como as formas de prevenção da infecção por esse vírus.

PALAVRAS-CHAVE - Câncer de colo uterino. Papilomavírus humano. HPV. Cérvico-uterina. Carcinogênese.

SUMMARY - The infection by Human Papillomavirus (HPV) represents an authentic challenge when talking about public health because it affects millions of individuals all over the world. There are more than 100 different types of HPV and can be classified in low or high risk for the development of the cancer. HPV type 6 and 11, found in most of the genital warts and laryngeal papillomas, seem not to offer any risk of progressing to malignance. The viruses of high risk (mainly types 16, 18, 31, 33, 45, 58) have greater probability of persisting and being associated to pre-cancerous lesions and genital tumors. The infection by HPV in the human cervix is the first step for the cervix-uterine cancer. Two measures of prevention can be adopted: use of the prophylactic HPV vaccine and the accomplishment of the Papanicolaou examination of preventive form, that in accordance with the Health department, brings effectiveness in the precocious diagnosis of the injuries.

The present work aims describe the involved factors with the HPV and its dimension in the participation of genese of the vaginal cervix cancer as well as the prevention forms.

KEYWORDS - Cervical cancer. Human papillomavirus. HPV. Uterine cervix. Carcinogenesis.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é o segundo câncer mais comum entre mulheres no mundo sendo responsável, anualmente, por cerca de 471 mil casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. A incidência por câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres^{8,14}.

Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada para o câncer de colo do útero, em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento os casos são encontrados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de cerca de 49% após cinco anos. A média mundial estimada é de 49%⁸.

Estudos epidemiológicos sugerem que o risco dessa neoplasia está relacionado também a outros fatores: idade da iniciação sexual, múltiplos parceiros, fatores sócio-econômicos, número de gravidez, tabagismo, uso de contraceptivo hormonal oral e história de doenças sexualmente transmissíveis^{1,6,8}.

Dentre as viroses que acometem a região genital, a infecção por Papilomavírus humano (HPV) é considerada a mais frequente. O Brasil ocupa posição de destaque no ranking de contaminação pelo vírus com 34 milhões de brasileiros e brasileiras infectados⁹.

Estudos comprovam a relação causal entre a infecção persistente por tipos oncogênicos do Papilomavírus humano e o desenvolvimento do câncer do colo útero e de suas lesões precursoras⁴. Segundo BOSCH *et al.*, 2002; SASLOW *et al.*, 2007 o câncer cervical não se desenvolve na ausência do DNA viral.

O Papilomavírus humano

Existem mais de 100 genótipos do vírus. Está comprovado que alguns tipos são mais agressivos que outros no sentido de promover o câncer. Cada tipo pode também causar diferentes manifestações clínicas. Os tipos 6 e 11 são causadores de condiloma acuminado ou verruga genital, popularmente conhecido como crista de galo, doença considerada benigna. Os HPV de tipos 16 e 18, considerados de alto risco, estão intimamente relacionados com lesões intraepiteliais, com possibilidade de evolução para o câncer em 70% dos casos. O tipo 16 do HPV, é detectado em cerca de 60% das Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau (HSIL) e na maioria dos cânceres cervicais invasivos, porém em apenas 20% das lesões de baixo grau. O Tipo 18 de HPV é detectado em apenas 5% das HSILs e em cerca de 20% dos carcinomas escamosos invasivos. O tipo 18 do HPV possui uma afinidade especial pelo epitélio da endocérvice e está presente em carcinomas de pequenas células^{5,6,14}.

Além desses dois, outros HPVs mais comuns em lesões anogenitais são: 6, 11, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 59. Os tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 e 61 são

Recebido em 16/07/2008

Aprovado em 30/10/2009

¹Farmacêutica Bioquímica – Ponta Porã – MS

²Farmacêutica Bioquímica – Maringá – Pr

³Professora Associada de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá – Farmacêutica Bioquímica, Doutora em Saúde Pública - Maringá – Pr

⁴Professor Assistente III, Faculdade de Farmácia e Faculdade de Medicina – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Professor Adjunto, Faculdade de Farmácia – Universidade Positivo.

encontrados em cerca de 50% das lesões de baixo grau (LSIL), porém em apenas 20% das de alto grau 6, 7.

Transmissão do HPV

A infecção por HPV é considerada a Doença Sexualmente Transmissível (DST) de origem viral mais incidente na população mundial, o que representa um grave problema de saúde pública¹⁶.

A infecção pode ocorrer em até alguns anos após o início do intercurso sexual. Conforme a análise de SASLOW *et al.*, 2007, 50% das mulheres universitárias estudadas adquiriram infecção por HPV nos 4 anos após o primeiro intercurso, metade dos homens e 80% de mulheres sexualmente ativas adquirem HPV em alguma fase da vida.

O vírus entra na célula pela pele e mucosas, estimulando o crescimento das células da camada espinhosa. O crescimento se faz por expansão clonal, levando o epitélio a formações verrucosas. A replicação viral ocorre no núcleo da célula hospedeira⁷.

Tanto as verrugas genitais humanas como as neoplasias (os carcinomas epidermóides da cérvix, vagina e pênis) apresentam o DNA e RNA do HPV, comprovando a associação do HPV com essas lesões^{3, 7, 13}.

Período de Incubação

O período de incubação pode ser de semanas até anos. No entanto, geralmente se manifesta entre duas semanas a oito meses. O vírus pode permanecer no estado latente e os fatores que desencadeiam o aparecimento das lesões, não são conhecidos, permanecendo a sua manifestação ainda de forma indefinida^{7, 12}.

HPV e Carcinogênese

Estudos de coorte, realizados por Koutsky *et al.* (1992), sugerem que as mulheres infectadas pelo Tipo 16 ou 18 do HPV e que apresentavam esfregaços cervicais normais, possuem risco 30 vezes maior de desenvolver lesões de alto grau no período de 18 meses quando comparadas àquelas sem infecção. Aquelas que apresentavam lesões de baixo grau e HPV 16, evoluíram para lesões de alto grau⁶.

Os estudos sugerem que as infecções pelos tipos oncogênicos do HPV 16 e 18 desempenham um papel importante na gênese das lesões pré-cancerosas, sendo o vírus necessário, porém, não suficiente para desencadear a carcinogênese. Essa correlação entre tipos de HPV de alto risco, câncer cervical e suas lesões precursoras ficou comprovada após os estudos com metodologia molecular, onde se identificou o DNA de HPV de alto risco em 84 a 99,7% dos cânceres cervicais. Essa variação depende da metodologia empregada bem como da população estudada¹⁵.

Em 90% dos casos, a infecção por HPV é um fenômeno transitório, não sendo mais detectado o DNA do vírus após 36 meses. Entretanto, algumas mulheres, provavelmente por falha dos mecanismos imunológicos, apresentam persistência da infecção podendo evoluir para uma transformação maligna. As mulheres que apresentam a infecção persistente por HPV constituem o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, com risco relativo de 100 a 300 vezes em relação àquelas cuja infecção não foi persistente¹³.

O estudo de ZAMPIROLO, 2007, realizado em Santa Catarina, mostra que 58% da população examinada foi positiva para HPV. Destes, 66,4% apresentaram HPV de alto risco, sendo sua maior frequência em mulheres acima de 35 anos, enquanto que em mulheres com idade menor que 35 anos, o HPV de baixo risco foi mais frequente. O

pesquisador supõe que na maioria das mulheres, o contágio aconteça no início da vida sexual, sendo uma infecção transitória, pode não apresentar evidências clínicas, podendo ser suprimida, alcançando a cura espontaneamente. Porém, mesmo que seja encontrado o DNA do HPV de alto risco nas lesões intraepiteliais, a evolução dessas lesões para câncer parece não ocorrer em todos os casos. A regressão espontânea pode ocorrer em torno de 50% dos casos. Mesmo assim não é possível determinar quem desenvolverá a cura espontânea e qual o mecanismo envolvido.

Segundo ROTELI-MARTINS *et al.*, 2007, no artigo '**Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro**', há uma associação significativa entre o início da atividade sexual precoce e a aquisição de infecção de HPV. A associação entre infecção pelo HPV e desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) também é evidente, com risco relativo variando entre 20 e 70 por cento. Esse dado é consistente com resultados reproduzidos em diferentes populações uma vez que estudos de coorte demonstram, de forma inquestionável que a infecção precede o início das lesões intra-epiteliais, contribuindo para o melhor conhecimento a respeito da história natural da doença¹³.

Mulheres tabagistas e portadoras de outras infecções sexualmente transmissíveis como herpes, clamídea ou HIV são mais susceptíveis à evolução para lesões mais severas. Sugere-se que predisposições genéticas possam acelerar o processo de malignização, porém, necessitam ainda de comprovação^{9, 15}.

As evidências científicas atuais sugerem que a infecção por HPV possa seguir quatro caminhos:

- em indivíduos imunologicamente competentes, apresentam-se como infecção transitória em aproximadamente 50%, com eliminação completa do vírus;
- DNA de HPV de alto risco pode ser detectado em 84 a 99,7% dos cânceres cervicais
- lesões persistentes e resistentes ao tratamento normalmente são ocasionadas por HPV de alto risco;
- em indivíduos que apresentam lesões pelo HPV, estas podem regredir espontaneamente em 30 a 50% dos casos

Prevenção

A vacinação profilática tem como meta reduzir a incidência de doença genital por HPV. Existem no mercado hoje duas vacinas profiláticas sendo ambas desenvolvidas na expressão recombinante da proteína do capsídeo principal, L1, do vírus. A quadrivalente, denominada de *Gardasil* (Merck & Cia. Inc.), protege contra HPVs do tipo: 6, 11, 16, e 18 e a outra, que é bivalente, denominada de *Cervarix* (GlaxoSmithKline), protege contra tipos 16 e 18. Desta forma é esperada uma redução na incidência de verrugas genitais com o uso das vacinas. Porém, a eficácia das vacinas é tipo-específica e deve ser administrada antes de qualquer exposição ao vírus. Contudo não se tem muitas informações quanto a duração da imunidade oferecida pela vacinação^{10, 14}.

A estratégia mais bem sucedida para a prevenção do câncer cervical foi a execução de programas que utilizam a citologia cervical esfoliativa, o teste de Papanicolaou. A introdução desses programas tem mostrado redução das taxas de câncer cervical dentro de 3 anos após implementação. Isso acontece devido a detecção precoce de lesões cervicais e o tratamento de lesões precursoras do câncer¹⁴.

CONCLUSÕES

Entre os fatores de risco para o surgimento do câncer cervical uterino e de suas lesões precursoras, a infecção cervical por tipos oncogênicos do papilomavírus humano (HPV) tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade. Certos tipos de HPV são admitidos como fator causal necessário, porém, não suficiente na etiopatogenia da lesão neoplásica. O desenvolvimento do câncer cervical é menos provável na ausência da infecção pelo HPV e de fatores coexistentes, que favorecem a persistência da infecção, entre os quais: tabagismo, uso de contraceptivos orais, antecedente de múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, início precoce das relações sexuais e déficit nutricional e imunológico, além de fatores genéticos¹⁵.

Vale lembrar que cada organismo possui um potencial diferente para responder tanto à infecção quanto ao processo de carcinogênese. Há casos que irão evoluir para câncer e outros que terão cura espontânea, sendo também fator que complementa a teoria de causalidade do HPV.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Linda Emiko Suzuki por todo apoio e disposição dispensados a este trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, de J. M. - Rastreamento, Diagnóstico e Tratamento do Carcinoma de Colo uterino. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetria e Sociedade Brasileira de Cancerologia, maio de 2001.
2. BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V. - The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v.55, p. 244-265, 2002.
3. CRUM, C. P.; NUOVO, G. J. - *Genital papillomaviruses and related neoplasms*. Raven Press, New York, 1991
4. International Agency for Research on Cancer (IARC) - *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses*. Lyon: IARC; v. 90, 2005.
5. KHAN, M. J.; CASTLE, P. E.; LORINCZ, A. T.; WACHOLDER, S.; SHERMAN, M.; SCOTT, D. R.; RUSH, B. B.; GLASS, A. G.; SCHIFFMAN, M. - The elevated 10 year risk of cervical precancer and cancer in womwn with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type specific HPV testing in clinical practice. *JNCI*, v.97 n 14, p.1072-1079, 2005.

6. KOSS, L. G. - *Introdução à citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas*. São Paulo: Editora ROCA LTDA, 2006.
7. LONGATTO FILHO, A.; SILVA FILHO, A. M. - *Colo Uterino e Vagina: Processos Inflamatórios - Aspectos Histológicos, Citológicas e Colpocitológicos*. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2000.
8. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA) - *Câncer do colo útero*. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 15/10/2007.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, ano 11, p.3-10, set/dez 2002.
10. MUNHOZ, N.; BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUÉ, X.; DÍAZ, M.; SANJOSE, S.; HAMMOUDA, D.; SHAH K. V.; MEIJER C. J. L. M. - Which Human Papillomavirus Types Shall We Vaccinate And Screen? *The International Perspective*. *International Union Against Cancer*, v. 111, p. 278-285, 2004.
11. NICOLAU, S.M. - Existe câncer do colo uterino sem HPV? *Rev. Assoc. Med. Bras.* V. 49, n. 3, São Paulo Jul/Set. 2003.
12. PEYRA E.A.; TACLA, M. - *I Consenso Brasileiro de HPV*. Cap 3. BG Editora e Produções Culturais, São Paulo, p.17- 2000.
13. ROTELI-MARTINS, C. M.; LONGATTO FILHO, A.; HAMMES, L. S.; DERCHAIN, S. F. M.; NAUD, P.; MATOS, J. C.; ETLINGER, D.; SARIAN, L.; GONTIJO, R. C.; MAEDA, M. Y. S.; SYRJANEN, K. J. - Associação entre idade ao início da atividade sexual e subseqüente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v.29, n.11, nov.2007.
14. SASLOW, D.; CASTLE, P. E.; COX, T. J. DAVEY, D. D.; EINSTEIN, M. H.; FERRIS, D. G.; GOLDIE, S. J.; HARPER, D. M.; KINNEY, W.; MOSCICKI, A. B.; NOLLER, K. L.; WHEELER, C. M.; ADES, T.; ANDREWS, K. S.; DOROSHENK, M. K.; KAHN, K.G.; SCHMIDT, C.; SHAFETY, O.; SMITH, R. A.; PARTRIDGE, E. E.; GARCIA, F. - American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *American Cancer Society, Cancer J. Clin.*, v.57, p. 7-28, 2007.
15. SILVA, T. T.; GUIMARÃES, M. L.; BARBOSA, M. I. C.; PINHEIRO, M. F. G.; MAIA, A. F. - Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev. bras. ginec.*, mai 2006.
16. ZAMPIROLO, J A; MERLIN, J C; MENEZES, M E. - Prevalência de HPV de baixo e alto risco pela técnica de biologia molecular (captura híbrida II) em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)*, v. 39(4), p. 265-268, 2007.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Márcia Mayumi Ito

E-mail: cutie_mayumi@yahoo.com.br



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

A Incidência de Papilomavírus Humano em Mulheres no Hospital Universitário Sul Fluminense

The presence of Human Papillomavirus infection in Women at Sul Fluminense University Hospital

Tainá Carneiro de Castro Monte & Gustavo Lopes Peixoto

RESUMO - Introdução: A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é transmitido por meio de relação sexual e é considerado fator principal para o aparecimento de lesões precursoras de alto risco em cérvix uterina. Objetivo: Avaliar a incidência de infecção pelo HPV em mulheres submetidas à colposcopia oncológica, no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, e seu potencial de associação no desenvolvimento do câncer. Método: Estudo retrospectivo dos laudos citológicos, em mulheres na faixa etária de 14 a 60 anos atendidas no Hospital Universitário Sul Fluminense, Vassouras, RJ, com posterior análise dos dados obtidos. Resultado: Observou-se que 32,1% dos exames apresentaram LSIL (NIC I); 57,5% HSIL (NIC II e NIC III); 3,8% ASCUS; 2,8% carcinoma invasivo; 27,4% reativo-inflamatórias; 14,2% alterações por lesão e que 77,4% do diagnóstico estão associados à ocorrência de infecção pelo papiloma vírus humano. Conclusão: A ocorrência de infecção pelo HPV é elevada em todas as faixas etárias estudadas e, de acordo com a revisão bibliográfica pesquisada, certos tipos de HPV são capazes de induzir lesões para neoplasias de diferentes graus, destacando educação em saúde na área de prevenção de câncer uterino e DSTs.

PALAVRAS-CHAVE - papiloma vírus humano, colposcopia oncológica, neoplasia intra-epitelial, prevenção.

SUMMARY - Introduction: Human papillomavirus (HPV) infection is transmitted by intercourse and represent the major reason to appearance high risk lesions on uterine cervix. Objective: Estimate the prevalence of HPV infection on women that was submitted to oncolytic colposcopy, during the period of january 2006 to july 2007, and afterwards, also estimate the potential association with cancer development. Methods: Retrospective study of the papers, on 14 to 60 years old women, served at Sul Fluminense University Hospital, Vassouras, RJ, and posterior results analysis. Results: It was observed that 32,1% of the papers showed LSIL (NIC I); 57,5% HSIL (NIC II and NIC III); 3,8% ASCUS; 2,8% advanced carcinon; 27,4% inflammation reaction; 14,2% lesions; 77,4% of diagnosis associated to HPV infection. Conclusion: The occurrence of HPV infection is high in every age that was studied, and according to the recents papers, some HPV serotypes are capable to induce neoplasia.

KEYWORDS - human papillomavirus, oncolytic colposcopy, cervical intraepithelial neoplasia, prevention.

INTRODUÇÃO

1 – Carcinoma Cervical

O câncer do colo uterino é a segunda doença maligna mais comum entre mulheres, constituindo um dos mais graves problemas de saúde pública. Esse câncer geralmente possui uma evolução lenta, apresentando fases pré-invasivas e, portanto, benignas, caracterizadas como lesões pré-malignas ou pré-cancerosas. O período de evolução de uma lesão cervical inicial para forma invasiva, ou seja, maligna, pode durar até 20 anos (SILVEIRA, *et al.*, 2005).

O carcinoma cervical é precedido por uma série de modificações no epitélio original que constituem as lesões pré-malignas, que podem ser classificadas utilizando uma associação entre o Sistema Bethesda e a classificação de Richart que relaciona lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC I) e, nos casos de infecção por HPV, lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL) com NIC II e NIC III. Estas lesões são caracterizadas histologicamente por uma desorganização da arquitetura do epitélio escamoso por atipias nucleares e figuras de mitoses anormais (GOMPEL e KOSS, 1997; BUFFON, *et al.*, 2006).

O câncer cervical possui incidência mundial de cerca de 500.000 casos por ano, tendo tomado proporções epidêmicas em países em desenvolvimento, do Brasil à Índia, devido à falta de rastreamento. Aproximadamente, 80% dos 500.000 casos novos de câncer por ano ocorreram em países pobres, principalmente da América Latina, África e Índia. As mulheres, em países com maior poder aquisitivo, têm acesso às novas tecnologias que, na maioria das vezes,

ainda não são encontradas nos países em desenvolvimento (NORONHA, *et al.*, 1999).

Estudos mostram que a incidência de carcinoma cervical é mais elevada em mulheres casadas e menos elevada em mulheres inativas sexualmente (SHEETS, 1999).

Estudos epidemiológicos também avaliam a relação da circuncisão com o câncer do colo uterino, mostrando que a incidência de câncer em mulheres casadas com homens que fazem parte do grupo que praticam a circuncisão é menor do que em outras mulheres (SHEETS, 1999).

1.1 – Histologia

A cérvix possui aproximadamente 2.5 a 3 cm de comprimento e ela se diferencia do "corpo" do útero por ser uma pequena porção intra-abdominal coberta por peritônio (SHEETS, 1999).

A histologia da cérvix é uma consideração importante para se entender como e onde as lesões benignas, pré-cancerosas e cancerosas ocorrem. A cérvix é essencialmente composta por dois tipos de epitélio: o epitélio escamoso e o colunar. A área de transição entre esses dois tipos de epitélio origina três zonas histológicas: a ectocérvix, a zona de transformação ou transição e a endocérvix. É a transição entre os epitélios colunar e escamoso que as lesões pré-cancerosas e cancerosas podem aparecer (SHEETS, 1999).

A ectocérvix é definida como o estroma cervical substituído de glândulas e coberto por epitélio escamoso estratificado e é onde ocorre a maturação progressiva e disciplinada das células, desde a camada basal mais inferior até a camada de células da zona superficial (SHEETS, 1999).

A camada basal, responsável pela regeneração epitelial,

Recebido em 08/07/2008

Aprovado em 19/01/2010

*Universidade Severino Sombra/Hospital Universitário Sul Fluminense/Laboratório de Anatomia Patológica

consiste em uma única fileira de pequenas e cilíndricas, células com grande núcleo e escasso citoplasma. Acima das células basais está uma camada de células poliédricas, organizadas em padrão de mosaico irregular e interconectadas com numerosos filamentos complexos. Essa característica é observada nas células parabasais (SHEETS, 1999). Acima das células parabasais está a camada de células intermediárias com núcleo vesiculoso, tendo dessa forma um citoplasma com o volume aumentado em relação ao núcleo. Essas células estão envolvidas em uma ascendente maturação. Há ainda um tipo especial de células intermediárias, conhecidas como células naviculares resultante da influência prolongada do progesterona (SHEETS, 1999). Acima da camada intermediária tem a camada superficial que consiste em células alongadas com núcleos picnóticos com citoplasma amplo com pouco glicogênio. Todas essas células escamosas são vistas no esfregaço citológico. As células intermediárias são ricas em glicogênio, mas aparecem "limpas" nas seções histológicas porque o glicogênio é lavado durante a fixação (SHEETS, 1999).

A zona de transição está entre a ectocérvice e a endocérvice, e consistem em estroma endocervical e glândulas cobertas pelo epitélio escamoso. Essa zona de transição está relacionada com a idade, a influência do estrogênio, traumas ocorridos ou cirurgias ocorrida na cérvix, e é onde ocorre o maior número de patologias por possuir os dois tipos de células (SHEETS, 1999).

Histologicamente, a endocérvice é uma única camada de células colunares altas caracterizadas por um núcleo basal espesso e citoplasma róseo devido às preparações realizadas com hematoxilina-eosina. Dois tipos de células estão presentes nesse epitélio: as células secretoras de muco e células ciliadas espalhadas localizadas no canal cervical e nos orifícios glandulares (SHEETS, 1999).

1.2 – Fatores de Risco

Existem diversos fatores de risco para o aparecimento do carcinoma cervical. A infecção por tipos específicos de Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator. O início precoce da atividade sexual, o número de parceiros sexuais durante a vida e a promiscuidade dos mesmos, a nutrição, parição ou multiparição, tabagismo, uso de contraceptivos orais e baixas condições sócio-econômicas também são consideradas alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino (STIVAL, *et al.*, 2005; MEDEIROS, *et al.*, 2005).

Outro fator de risco é o estado imunológico. Acredita-se que o estado de imunocompetência do hospedeiro pode ter algum papel na evolução das lesões cervicais. As células que o HPV infecta não possui resposta eficiente aos antígenos, tendo atraso em seu reconhecimento pelo sistema imune, facilitando sua multiplicação (ZIMMERMANN, *et al.*, 2006).

Mulheres que já possuem seu sistema imune debilitado, como, por exemplo, mulheres soropositivos para HIV, possuem uma maior probabilidade de desenvolver neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) comparada com a população em geral, devido à sua baixa imunidade, com estimativa de que tais pacientes têm até dez vezes mais chances de desenvolver NIC do que aquelas não portadoras do vírus (ZIMMERMANN, *et al.*, 2006).

A ectopia cervical tem sido outro fator relacionado com infecção por HPV e desenvolvimento do carcinoma cervical. Toon, *et al.*, demonstraram que mulheres com citologia normal e ectopia apresentam mais freqüentemente HPV-DNA que as mulheres sem ectopia, e que ectopia cervical

em mulheres com sinais citológicos de infecção por HPV é mais comum abaixo dos 30 anos (MURTA, *et al.*, 1999).

1.2.1 – Comportamento Sexual

Muitos estudos ao longo dos anos reforçam a associação do câncer cervical com a atividade sexual das mulheres (LIMA, *et al.*, 2006).

Harrys, *et al.*, (1980) e Rawl, *et al.*, (1986), apóiam esta idéia e, os autores, ainda, relatam que a parceria sexual múltipla aumenta a probabilidade de exposição a um agente sexualmente transmissível e a idade precoce ao primeiro coito torna o epitélio cervical mais susceptível à agressão oncogênica.

Para Paul, *et al.*, (1982), se o câncer cervical é causado por um agente sexualmente transmissível, os hábitos sexuais do homem também devem ser de grande importância.

Esse contexto foi encontrado nos estudos de Lima, *et al.*, (2006) e Teixeira, *et al.*, (1999). O primeiro registrou que, entre as mulheres estudadas, a maioria refere ter tido no máximo dois parceiros na vida e que achavam que seus companheiros tinham relacionamento extraconjugal e não usavam preservativos nestas relações. O segundo estudo, observou que o fato de o homem apresentar mais de uma parceira foi suficiente para aumentar em três a quatro vezes as chances de diagnóstico de HPV, independentemente do número de parceiras relatadas.

1.2.2 – Tabagismo

Pinto, *et al.*, (2002) afirmaram que o tabaco contribui para a oncogênese cervical através de dois mecanismos. O primeiro mecanismo está associado com o decréscimo das células de Langerhans no epitélio escamoso cervical, sugerindo diminuição da imunidade local. O segundo está ligado diretamente ao hábito de fumar e ocorre quando o DNA das células epiteliais cervicais é exposto a nicotina e a cotidina, além de outros componentes da fumaça.

Para os pesquisadores Aleixo Neto (1991) e Silva, *et al.*, (2006), o hábito de fumar favorece a infecção persistente e aumenta o risco do câncer do colo do útero, mesmo quando da ausência de outros fatores.

2 – ESTRUTURA VIRAL

O Papilomavírus Humano (HPV) é um DNA vírus da família Papillomaviridae; seu genoma consiste de uma dupla fita circular com aproximadamente 8000 pares de bases. O genoma viral pode ser dividido em três regiões: a região "early" (precoce) contendo os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são necessários à replicação viral e com propriedades de transformação oncogênica; a região "late" (tardia) contendo os genes L1 e L2 que possuem códigos para formação de proteínas do capsídeo viral e a região regulatória (LCR) que contém a origem da replicação e o controle dos elementos para transcrição e replicação (ALBRING, BRENTANO e VARGAS, 2006).

As proteínas produzidas pelos genes do HPV E6 e E7 são capazes de imortalizar e, eventualmente, transformar células. A expressão contínua destas proteínas virais nos tumores é essencial no desenvolvimento da neoplasia (<http://www.aids.gov.br>).

O DNA viral dentro da célula hospedeira pode assumir duas formas: a episomal e a integrada. Na forma episomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma.

Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. Para ocorrer a forma integrada, ou seja, para haver integração do genoma circular com o DNA da célula hospedeira, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1, resultando na ruptura ou perda do gene E2, sendo encontrado nas lesões de maior gravidade, como carcinoma "in situ" e invasivo (ALBRING, BRENTANO & VARGAS, 2006).

O HPV infecta mucosas e inicia seu ciclo infeccioso no instante em que penetra as camadas mais profundas do epitélio da cérvix uterina, em especial a junção escamo-colunar (JEC). A infecção por HPV tem sido descrita como fator necessário para ocorrência do câncer cervical (ALBRING, BRENTANO & VARGAS, 2006).

Uma fase obrigatória no seu desenvolvimento é a integração do DNA viral com o DNA das células hospedeiras, ocorrendo degradação do gene E2 do HPV levando ao aumento de proteínas virais de HPVs oncogênicos inativando os produtos dos genes supressores de tumor, ocorrendo a malignidade (OLIVEIRA, *et al.*, 2003).

A coilocitose é o primeiro aspecto citológico da manifestação do HPV, sendo uma célula escamosa intermediária, com grande vacúolo citoplasmático, núcleo anormal apresentando também disqueratose, binucleação ou multinucleação. Esse critério morfológico é comum a todos os tipos de HPV que infectam a área anogenital, sejam oncogênicos ou não (ALBRING, BRENTANO & VARGAS, 2006; GOMPEL e KOSS, 1997).

Existem aproximadamente 90 tipos de Papilomavírus Humano, sendo que desses 90, 30 tipos possuem tropismo pela região anogenital. Esses tipos são divididos em grupos de acordo com seu potencial maligno. O grupo considerado de baixo risco oncogênico é: 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73, e estes estão associados a LSIL, podendo provocar aparecimento de condilomas. O grupo considerado de alto risco é: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68, e estes estão associados a HSIL e carcinoma invasivo (STIVAL, *et al.*, 2005; CARVALHO, *et al.*, 2005).

Acredita-se que a infecção por HPV seja frequentemente sexualmente adquirida, originando uma das mais prevalentes doenças sexualmente adquiridas (DSTs). A transmissão ocorre na maioria dos casos no intercuro sexual, mas pode haver raramente casos onde não há atividade de penetração propriamente dita. Outra forma de transmissão também sendo considerada pouco comum é da mulher / mãe para o filho na hora do nascimento (GOMPEL e KOSS, 1997).

2.1 – Quadro Clínico

A maioria das infecções são assintomática ou inaparentes e de caráter transitório. As formas de apresentação são: clínica (lesões exofíticas ou condiloma) e a subclínica (quando visível apenas por meio de técnicas de magnificação e após aplicação de reagentes, como o ácido acético a 2-5%). O vírus também é capaz de estabelecer uma infecção latente onde não existem lesões identificáveis, apenas sendo detectável seu DNA por meio de técnicas de biologia molecular (<http://www.inca.gov.br>).

Os condilomas, dependendo do tamanho e da localização anatômica, podem ser friáveis, pruriginosos, úmidos e ceratinizados. Quando presentes no colo uterino, vagina, uretra e ânus, também podem ser ou não sintomáticos. Ainda, podem ser únicos ou múltiplos, localizados ou difusos e de tamanho variável. Tendem a aparecer em zonas que tenham sido traumatizadas durante o ato sexual (<http://www.inca.gov.br>).

2.2 – Diagnóstico

O diagnóstico precoce permite o rastreamento das lesões oriundas de infecção pelo HPV, que provocam alterações morfológicas características detectáveis em citologia de raspados cervicovaginais e biópsias. Com isso, são de suma importância os exames rotineiros de detecção precoce de câncer, através de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou (VALDERRAMA, *et al.*, 2006).

2.2.1 – Método de Papanicolaou

A introdução do método de Papanicolaou como teste de rastreamento há cerca de 50 anos resultou na redução dos índices de mortalidade por câncer cervical ao redor de 50 a 70%. Porém, as taxas de mortalidade por câncer cervical permanecem estáveis e até aumentaram em países com poucos recursos de implantações de rastreamento (SILVEIRA, *et al.*, 2005; RAMA, *et al.*, 2006).

Outras técnicas de rastreamento podem ser utilizadas em associação com exame de Papanicolaou, dentre elas, biologia molecular, assim tendo a associação da citopatologia com a identificação viral precoce garantindo não só um melhor diagnóstico da forma latente da doença, mas, também, a prevenção do desenvolvimento de patologias malignas (ZONTA, MARTINS e ABEL, 2005).

2.2.2 – Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas de três maneiras: para rastreamento, tendo a aplicação do exame em mulheres assintomática em programas de prevenção do câncer do colo do útero; para triagem, tendo a aplicação do teste de biologia molecular quando a paciente apresentar células anormais em exame citopatológico prévio, realizado com o objetivo de orientar a propedêutica e para seguimento, onde a aplicabilidade do teste HPV das pacientes, isto é, após diagnóstico e tratamento e é fundamentada na monitorização da recidiva via detecção molecular da persistência do vírus (<http://www.inca.gov.br>).

O teste molecular de captura híbrida para HPV é capaz de detectar o DNA de 18 tipos virais que mais comumente infectam a região anogenital. É um teste quantitativo e o único aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para diagnóstico de HPV. Em comparação com o método de reação em cadeia de polimerase (PCR), a captura híbrida demonstra sensibilidade de 91.7% e especificidade de 95.4% (TULIO, *et al.*, 2007).

2.2.3 – Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica utilizada em testes clínicos para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos, podendo ser considerada a mais sensível na identificação do DNA do HPV nos mais diferentes materiais clínicos. A detecção por PCR poder ser qualitativa indicando a presença do microorganismo em questão ou quantitativa, a qual pode avaliar a quantidade de material genético em uma amostra biológica. Os métodos de diagnóstico para a infecção por HPV baseados em PCR têm a maior sensibilidade de detecção dos genomas virais, quando comparados com outras metodologias (DO CARMO, Emily Francini Silva & FIORINI, Adriana, 2007).

Por intermédio da PCR é possível detectar e identificar o

material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico. Assim, o diagnóstico por PCR representa um complemento importante aos diagnósticos cito-histopatológicos e colposcópicos (DO CARMO, Emily Francini Silva & FIORINI, Adriana, 2007). Atualmente, existem várias modificações da técnica de PCR Convencional. Para a detecção de HPV a PCR em Tempo Real ou Q-PCR (PCR quantitativa) promove uma análise qualitativa e quantitativa, o que permite a estimativa da carga viral de uma amostra biológica. Esta técnica difere da PCR Convencional por utilizar sondas marcadas com fluoróforos que emitem uma fluorescência durante as amplificações e o sinal é detectado por um laser termociclador (DO CARMO, Emily Francini Silva & FIORINI, Adriana, 2007).

Devido à alta sensibilidade do método de PCR podem ocorrer resultados falso-positivos ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado. Esta restrição pode ser evitada com o uso da Q-PCR que realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade. Possibilita maior facilidade na quantificação, possui maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, e maior velocidade na análise. A liberação de fluorescência a cada ciclo é diretamente proporcional à quantidade de amplicon gerada, sendo considerado um método preciso de avaliar a carga viral e é projetado para manter a contaminação a um mínimo (DO CARMO, Emily Francini Silva & FIORINI, Adriana, 2007).

A PCR Convencional pode ser considerada o método mais sensível disponível, mas possui algumas limitações; assim, como a Captura Híbrida, não é possível quantificar de maneira significativa a carga viral (DO CARMO, Emily Francini Silva & FIORINI, Adriana, 2007).

2.2.4 – Colposcopia

A colposcopia, que também é um exame para diagnóstico, é realizada visualizando o colo uterino com o aumento de 10 a 40 vezes, utilizando a terminologia colposcópica que divide em: achados colposcópicos normais, anormais, suspeito de câncer invasor e achados insatisfatórios (STIVAL, *et al.*, 2005).

2.2.5 – Exame Histológico

O exame histológico é baseado no critério morfológico, arquitetural e celular, sendo considerado padrão ouro de diagnóstico morfológico. Esse exame é realizado em amostras retiradas de uma superfície suspeita de lesão ou malignidade. Para histopatologia é usada a classificação de Richart, que reúne lesão intra-epitelial escamosa ou NIC (STIVAL, *et al.*, 2005).

2.3 – Estudo Comparativo dos Métodos de Rastreamento para Detecção do Carcinoma Cervical

A idéia de triagem para detecção precoce do câncer do colo do útero foi aceita a partir do desenvolvimento de técnicas de citologia esfoliativa pelo Dr. George Papanicolaou, em 1941. A citologia pelo método Papanicolaou apresenta uma boa sensibilidade e alta especificidade quando utilizada em populações como método de triagem. Entretanto, a sensibilidade e especificidade do método se reduzem quando são analisadas em pacientes com alterações cervicais. A principal finalidade do método citológico é o rastreamento populacional das lesões intra-epiteliais, as quais podem ser mais bem definidas a partir de exame colposcópico e estudo anatomopatológico de material proveniente de biópsia, CAF ou cirurgia (TUON, *et al.*, 2002).

A sensibilidade do método colposcópico é elevada, identi-

ficando alterações com eficiência. Por outro lado, a especificidade é baixa. Quando se associa resultado da citologia com os da colposcopia, essa especificidade aumenta, reafirmando o papel importante da colposcopia para diagnóstico de lesões no colo uterino (TUON, *et al.*, 2002).

Na associação entre exames citológicos e histopatológicos, pode-se encontrar achados similares ao comparar resultados entre citologia cérvico-vaginal com a histologia por biópsia colpodirigida (TUON, *et al.*, 2002).

A correlação entre colposcopia e histologia é semelhante à concordância entre a citologia e histologia. O valor dessa correlação está relacionado com as lesões, podendo se encontrar baixo pela discrepância das lesões classificadas como lesões menores, havendo uma tendência dos colposcopistas e ginecologistas em diagnosticá-las como negativas (TUON, *et al.*, 2002).

Esse erro é diminuído quando há discordância entre o laudo citológico e a avaliação colposcópica, levando o profissional a realizar uma biópsia dirigida e confirmar o diagnóstico pela histologia (TUON, *et al.*, 2002).

Dessa forma, a associação do método colposcópico ao citológico é eficaz na detecção das alterações neoplásicas do colo do útero, sendo a correlação cito-colpo-histológica de fundamental importância na identificação das categorias de maior dificuldade diagnóstica, como nas lesões de baixo grau (TUON, *et al.*, 2002).

2.4 – Tratamento

Os tratamentos convencionais da infecção pelo HPV são utilizados para coibir as manifestações clínicas da infecção genital, dentre elas os condilomas sintomáticos, tendo finalidade de destruição do epitélio infectado, sejam por meios químicos (TCA, podofilina), físicos (laser), cirúrgicos ou por drogas citotóxicas. A remoção da lesão pode ou não diminuir sua infectividade (MARANA, *et al.*, 1999).

Os fatores que podem influenciar a escolha do tratamento são o tamanho, número e local da lesão. A preferência do paciente, custos, disponibilidade de recursos, conveniência, efeitos adversos à experiência do profissional de saúde também devem ser considerados (<http://www.inca.gov.br>). Se as lesões causadas pela infecção evoluírem para a malignidade, o tratamento a ser seguido tem sido tratado como uma sugestão radical, como, por exemplo, fazer histerectomia da paciente ou radioterapia. A radioterapia pode ser utilizada antes da cirurgia, após ou, ainda, como uma única modalidade terapêutica (SHEETS, 1999).

2.5 – Prevenção

A prevenção e o diagnóstico precoce para Sebastião, *et al.*, (2004), constituem as formas ideais para reduzir a morbidade e a mortalidade decorrentes do câncer do colo do útero, um problema de saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento.

A prevenção, para se evitar infecções por HPV, consiste na utilização de preservativos, fazendo dessa forma uma barreira física. Recentes estudos mostram que houve uma significativa redução na infecção pelo vírus em jovens que mesmo tendo iniciado a vida sexual, tem seus parceiros fazendo o uso de preservativos de forma correta (SHEETS, 1999).

As estratégias de prevenção do câncer do colo uterino consistem no diagnóstico precoce da doença. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas realizem a colpocitologia anualmente a partir de 25 anos de idade e que o mesmo se repita a cada 3 anos, após 2 resultados negativos consecutivos (STIVAL, *et al.*, 2005; SILVEIRA, *et al.*, 2005).

De acordo com Lima, *et al.*, (2006) e Motta, *et al.*, (2001),

para se obter ação preventiva é necessária a criação de estratégias que atinjam toda a população de risco, com informação constante, promovendo a compreensão dos fatores de risco associados, em especial os de características sexuais.

3 – IMUNIZAÇÃO

Em junho de 2006, a ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) e a FDA (Food and Drug Administration) aprovaram a vacina que previne contra quatro tipos de HPV: 6, 11, 16 e 18. A vacina, Gardasil, será utilizada por mulheres entre 9 e 26 anos na prevenção a precursores cancerosos, incluindo, lesões pré-cancerosas no colo do útero, vagina e vulva (MARKOWITZ, *et al.*, 2007).

A vacina é composta pela proteína L1, responsável pela formação do capsídeo protéico do HPV, sendo o antígeno utilizado. Ocorre a expressão da proteína L1 em leveduras utilizando a tecnologia de DNA recombinante produzindo partículas virais não infecciosas (VLP) que se assemelham a HPV vírions. A vacina é uma mistura dos quatro tipos específicos de HPV com os VLP's preparados, provenientes das proteínas L1 do HPV 6, 11, 16 e 18 combinados com alumínio adjuvant (MARKOWITZ *et al.*, 2007).

Cada dose de 0.5 ml contém 20 µg da proteína L1 do HPV 6, 40 µg da proteína L1 do HPV 11, 40 µg da proteína L1 do HPV 16, 20 µg da proteína L1 do HPV 18 e 225 µg de hidróxido de alumínio amorfo. Na formulação, ainda incluem sodium chloride, L-histidine, sodium borate e água para injeção. A vacina não contém nenhum tipo de antibiótico (MARKOWITZ, *et al.*, 2007).

A vacina é administrada de forma intramuscular em três doses. A segunda dose deve ser feita dois meses depois da primeira e a terceira dose, deve ser feita seis meses depois da segunda. A vacina deve ser administrada em mulheres que previamente não a tomaram ou nas que não tomaram as três doses. O mais correto seria administrar a vacina antes da exposição ao HPV através do contato sexual, mas as mulheres que foram expostas ao vírus também devem ser vacinadas (MARKOWITZ, *et al.*, 2007).

Os exames realizados para detecção do vírus devem ser feitos mesmo em mulheres que utilizaram a vacina. Mulheres que apresentarem o exame de Papanicolaou anormal podem ter sido infectadas com algum dos 30 tipos de HPV que tem afinidade pela região anogenital, dentre eles, os quatro tipos que constituem a vacina (6, 11, 16 e 18), já que os mesmos são responsáveis por mais de 70% dos casos de câncer cervical. Mulheres que foram vacinadas podem ser infectadas com algum dos tipos carcinogênicos de HPV encontrados na vacina, não tendo adquirido imunidade contra os mesmos (MARKOWITZ, *et al.*, 2007). Imunossuprimidos podem fazer utilização da vacina, porém a resposta imune e a eficácia da mesma podem ser comprometidas. A vacina não é recomendada na gravidez e nas pessoas que apresentem alguma história de hipersensibilidade, principalmente a alguns componentes da vacina. Síncope pode ocorrer após a administração da vacina, principalmente em adolescentes e jovens adultos; por isso, deve-se fazer observação do paciente por 15 minutos após a vacina ser administrada (MARKOWITZ, *et al.*, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação foi realizada por meio de um estudo descritivo retrospectivo em prontuários de pacientes que buscaram atendimento no Hospital Universitário Sul Fluminense, na cidade de Vassouras, no Estado do Rio de Janeiro, no

período de janeiro de 2006 a julho de 2007. Os exames citopatológicos foram coletados e encaminhados com os dados pessoais e clínicos de cada paciente para o Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Sul Fluminense.

RESULTADOS

O levantamento estatístico das amostras está baseado nos 106 laudos citológicos emitido pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Sul Fluminense – HUSF. No processo de revisão dos resultados foram identificadas duas variáveis: idade dos pacientes e resultado citológico, como se pode observar nas quatro tabelas apresentadas após o texto.

Tabela 1: Os dados foram agrupados nas faixas etárias de: 14 a 29 anos; 30 a 44 anos; 45 a 60 anos e computados de acordo com o resultado do exame citológico.

TABELA I

Levantamento dos resultados, com diagnóstico citopatológico no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, por faixa etária realizado no Hospital Universitário Sul Fluminense, Vassouras, RJ, 2007.

Diagnóstico Citopatológico	14 – 29	30 – 44	45 – 60
LSIL – NIC I	12	16	6
HSIL – NIC II	15	15	1
HSIL – NIC III/Carcinoma In Situ	10	16	4
ASCUS	1	1	2
Carcinoma Invasivo	0	1	2
Atipia Reativa / Inflamatória	5	13	11
Lesões	7	8	0

Obs.: A maioria dos laudos apresenta resultados com mais de um diagnóstico, por paciente.
Fonte: Amostra do estudo (laudos citológicos).

Tabela 2: Observa-se que dos laudos citológicos analisados 32,1% dos pacientes apresentaram LSIL (NIC I); 57,5% apresentaram HSIL (NIC II e NIC III); 3,8% apresentaram ausência de alterações celulares que possam ser classificadas como neoplasia intra-epitelial cervical (ASCUS); 2,8% dos exames apresentaram Carcinoma Invasivo e 41,6% dos laudos apresentaram algum tipo de agressão / lesão ao Trato Genital Inferior.

TABELA II

Distribuição de frequência quanto ao laudo citológico na população estudada.

Laudo Citológico	Frequência	%
LSIL – NIC I	34	32,1
HSIL – NIC II	31	29,2
HSIL – NIC III/Carcinoma In Situ	30	28,3
ASCUS	4	3,8
Carcinoma Invasivo	3	2,8
Atipia Reativa / Inflamatória	29	27,4
Lesões	15	14,2

Obs.: A maioria dos laudos apresenta resultados com mais de um diagnóstico, por paciente.
Fonte: Amostra do estudo (laudos citológicos).

Tabela 3: Observa-se que os resultados dos exames com diagnóstico de lesões intra-epiteliais de alto grau estão prevalentes em 57,7% dos exames analisados com incidência maior nas faixas etárias de: 14 a 29 anos com percentual de 23,6% e de 30 a 44 anos com 29,3%.

TABELA III
Distribuição de frequência quanto ao diagnóstico, por faixa etária na população estudada.

Diagnóstico	14 – 29 %	30 – 44 %	45 – 60 %
LSIL – NIC I	12 11,3	16 15,1	6 5,7
HSIL – NIC II	15 14,2	15 14,2	1 1,0
HSIL – NIC III/Carcinoma In Situ	10 9,4	16 15,1	4 3,8
ASCUS	1 1,0	1 1,0	2 1,8
Carcinoma Invasivo	0 0	1 1,0	2 1,8
Atipia Reativa / Inflamatória	5 4,7	13 12,2	11 10,4
Lesões	7 6,6	8 7,5	0 0

Obs.: A maioria dos laudos apresenta resultados com mais de um diagnóstico, por paciente.
Fonte: Amostra do estudo (laudos citológicos).

Tabela 4: Observa-se que o percentual de 77,4% dos resultados da colpocitologia oncótica está associado à ocorrência de infecção pelo Vírus Papiloma Humano – HPV.

TABELA IV
Distribuição de frequência quanto ao diagnóstico, por faixa etária na população estudada.

	Frequência	%
Associação à infecção pelo HPV	82	77,4
Não associação à infecção pelo HPV	24	22,6
Total	106	100,0

Fonte: Amostra do estudo (laudos citológicos).

DISCUSSÃO

Dos 106 prontuários analisados, de mulheres que procuraram o Hospital Universitário Sul Fluminense – HUSF, Vassouras, RJ, para realização do exame preventivo do câncer de colo uterino (Papanicolaou), no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, observou-se por diagnóstico citológico que 82 (77,4%) dos resultados estão associados à ocorrência de infecção pelo Papiloma Vírus Humano – HPV.

O estudo permitiu evidenciar a distribuição por faixa etária demonstrando que 35,8% tinham de 14 a 29 anos; 45,2% entre 30 e 44 anos e 19,8% entre 45 e 60 anos. Dos cento e seis laudos estudados, a maior ocorrência (81%) pertencia à faixa etária compreendida entre 14 e 44 anos.

Em relação ao resultado citológico, todos os exames (100%) estudados apresentaram algum tipo de alteração celular (por exemplo: inflamação). Os diagnósticos foram agrupados em conformidade com os dados descritos nos laudos e registrados nos 106 prontuários analisados. Desses, 34 (32,1%) apresentaram positividade para lesões de baixo risco (LSIL – NIC I); 61 (57,5%) apresentaram positividade para lesões precursoras de alto risco de evolução para câncer (HSIL – NIC II e NIC III); 4 (3,8%) foram

classificadas como ASCUS (atipias de significado indeterminado em células escamosas) por apresentar ausência de alterações celulares que possam ser classificadas como neoplasia intra-epitelial cervical; 3 (2,8%) dos exames apresentaram carcinoma invasivo; 29 (27,4%) apresentaram alterações reativo-inflamatórias e 15 (14,2%) apresentaram algum tipo de alteração celular por lesão. Vale ressaltar que 44 mulheres do estudo (41,5%) apresentaram diagnóstico persistente de lesões e foram encaminhadas para colposcopia para uma melhor investigação e, quando necessário, para a Cirurgia de Alta Frequência (CAF) devido às alterações citopatológicas e colposcópicas.

Para reforçar os resultados encontrados, estão descritos abaixo alguns estudos realizados: a primeira pesquisa foi estudada por Noronha L V, *et al.*, 2005, que objetivaram verificar a prevalência de HPV e de outros co-fatores de risco para câncer e lesões precursoras, em colo uterino; o segundo estudo foi realizado por Eleutério Jr. J, *et al.*, 2004, e tinham como objetivo correlacionar diagnósticos citológicos com colposcopia e achados de biópsia em casos de lesões epiteliais do colo do útero; na terceira pesquisa Silva O J R, *et al.*, 2003, apresentam um estudo onde analisam a prevalência de lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau, em pacientes infectadas pelo HIV; no quarto trabalho descrito, Ferreira H, *et al.*, (2006), apresentam um estudo sobre o rastreamento de NIC (neoplasia intracervical) em um grupo de mulheres portadoras de vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Noronha, *et al.*, (2005), estudou 491 mulheres submetidas à colposcopia oncótica, na Unidade Materno-Infantil do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade do Estado do Pará, visando à detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV). Como critérios para inclusão dessas participantes no estudo, os autores exigiram: idade de 30 a 45 anos; procura espontânea pelo exame preventivo do câncer de colo uterino; não estar em período gestacional; não ser hysterectomizada e nem ter sido submetida à cirurgia em colo uterino.

Noronha, *et al.*, (2005), para fins de análise estatística, dividiram as participantes do estudo em dois grupos, de acordo com resultado da citologia oncótica, baseando-se na classificação de Bethesda: Grupo A: presença de quaisquer das seguintes alterações (ASCUS e/ou AGUS; LSIL; HSIL) e Grupo B: dentro dos limites da normalidade.

Noronha, *et al.*, (2005), encontraram os seguintes resultados: 12% (59/491) apresentavam-se fora dos padrões de normalidade. Dos 46 diagnósticos agrupados como de ASCUS/AGUS, 41 eram ASCUS, 3 eram ASCUS e AGUS e 2 eram apenas AGUS. A prevalência de HPV na população estudada foi de 12,6% (62/491), sendo significativamente mais elevada entre as que apresentavam citologia alterada (Grupo A), quando comparadas às citologias dentro da normalidade (Grupo B), com frequência de 44,1% (26/59) nas pacientes do grupo A e 8,3% (36/432) nas do Grupo B.

Segundo esses autores, os tipos considerados de alto risco foram detectados em 39% das mulheres do Grupo A (23/59), 28% (13/46) das com ASCUS, 71% das com LSIL (5/7) e 83% das com HSIL (5/6) e, em 4,4% (19/432) das do Grupo B. Dentro do subgrupo das infectadas dos Grupos A e B, o HPV de risco esteve presente em 88,5% (23/26) e 52,8% (19/36), respectivamente. O HPV 16 foi o mais frequente, tendo sido detectado em 30,8% (8/26) das infectadas do Grupo A e em 8,3% (3/36) do Grupo B.

Noronha, *et al.*, (2005), também observaram que houve associação estatisticamente significativa entre presença de HPV, presença de HPV de alto risco e de HPV 16 com

mulheres do Grupo A. Dentre os co-fatores de risco, os autores observaram que, iniciação sexual com idade igual ou inferior a 15 anos, foi significativamente associada com as pacientes do Grupo A, com diagnóstico citológico de ASCUS/AGUS, LSIL e HSIL. Com as demais variáveis não encontraram associação significativa.

Noronha L V, *et al.*, 2005, concluíram que os achados são coerentes com inúmeros trabalhos da literatura nacional e mundial, tanto quanto à prevalência de HPV, quanto aos tipos presentes em esfregaços de material colhido de cérvix uterina.

No segundo estudo, Eleutério, *et al.*, (2004), realizaram suas pesquisas nos arquivos do Laboratório de Citologia da Maternidade Escola Assis Chateaubriand, de Fortaleza, onde analisaram 242 casos de citologia cérvico-vaginal atípica, diagnosticados pelo exame de Papanicolaou como anormalidades epiteliais, onde se incluíam casos de ASCUS, LSIL, HSIL, células glandulares atípicas e carcinoma escamoso. Desses, 35 casos que tinham colposcopia e biópsia foram catalogados para estudo de achados.

Segundo os autores, os laudos histopatológicos foram dados conforme a classificação de Richart, de acordo com a orientação da Sociedade Brasileira de Patologia. Os diagnósticos citopatológicos foram confrontados com os achados colposcópicos e laudos histopatológicos para se observar o nível de concordância.

Eleutério, *et al.*, (2004), observaram dentre os casos com biópsia guiada por colposcopia, os seguintes resultados: 6 casos de ASCUS (17%); 17 casos de LSIL (48%); 10 casos de HSIL (29%); 1 caso de AGUS (3%) e 1 caso de carcinoma escamoso invasor (3%). Foram também observados na colposcopia, zona de transformação atípica (zta) em 85,7% dos casos para ASCUS; 93% para LSIL e 90% como HSIL. Em relação à avaliação das biópsias, Junior, *et al.*, (2004), evidenciaram que quando o diagnóstico citológico foi ASCUS em 16,7%, a biópsia foi normal, citopatia por Papiloma Vírus Humano (HPV) foi diagnosticado em 33,4%, neoplasia intra-epitelial cervical grau I (NIC I) em 16,7% e NIC I e HPV em 16,7%, além de neoplasia intra-epitelial cervical grau III (NIC III) em 16,7%. Quando o achado foi LSIL, a biópsia foi normal em 26,7 % dos casos, o diagnóstico de HPV ocorreu em 6,7%, de NIC I em 6,7%, de NIC I e HPV em 33,3%, de neoplasia intra-epitelial escamosa grau II (NIC II) em 20% e de NIC III em 6,7%. Nos casos HSIL, a biópsia foi normal em 10%, NIC I em 10%, NIC I e HPV em 20% e NIC II em 30%, NIC III em 30%. O caso de carcinoma escamoso foi confirmado pela biópsia e o caso de AGUS foi diagnosticado histologicamente como NIC III.

Em sua pesquisa, Eleutério Jr. J, *et al.*, 2004, concluíram que a biópsia guiada por colposcopia é essencial para a conduta adequada de lesões epiteliais cervicais. Segundo esses autores, uma conduta baseada só na citologia pode levar a um sub ou sobre tratamento.

Silva, *et al.*, (2003), formaram um banco de dados consolidado para análise com 354 pacientes de um total de 420 infectadas pelo HIV atendidas em serviços públicos de saúde do Rio de Janeiro, entre 1996 e 2000. A colposcopia foi realizada sistematicamente em todas as pacientes. A presença de lesão intra-epitelial cervical de alto grau (HSIL) foi comparada com variáveis disponíveis e de interesse clínico. O diagnóstico de lesão de alto grau foi obtido em amostras analisadas a histopatologia, quando eram observados os aspectos colpocitológicos de padrão B, C e alguns achados de padrão E da classificação colposcópica de Roma (1990).

O estado imunológico foi analisado através da contagem dos linfócitos T CD4, células-alvo do HIV e principal parâmetro laboratorial de acompanhamento da infecção. A amostra contou com 64,4% de pacientes com contagem abaixo de 500 céls/mm³, 48,1% abaixo de 350 céls/mm³ e 24,8% abaixo de 200 céls/mm³.

Em relação ao tabagismo, presente em 40% das pacientes, os autores optaram pelo critério de aferir o uso atual do tabaco, não considerando o seu uso no passado, nem a quantidade de cigarros. De acordo com Silva, *et al.*, (2003), esse resultado está de acordo com os estudos que apontam o fumo como oncógeno para o epitélio cervical.

Após submeter os dados à análise, Silva, *et al.*, (2003), observaram no estudo que a idade menor que 33 anos, mediana da amostra, que se declararam fumantes e possuíam nível de CD4 inferior a 350 céls/mm³, apresentaram associação significativa com a presença de lesão intra-epitelial de alto grau.

Nesse trabalho, os autores puderam relacionar os resultados encontrados com a tendência observada na incidência do câncer do colo e de suas lesões precursoras, ao aumento da prevalência do HPV, em especial, nas pacientes infectadas pelo HIV.

Silva, *et al.*, (2003), concluíram em sua pesquisa que é alta a prevalência de lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau em pacientes infectadas pelo HIV. A imunodeficiência, o hábito de fumar e a idade abaixo de 33 anos foram variáveis associadas à presença dessas lesões.

Ferreira, *et al.*, (2006), realizaram seu estudo acompanhando 30 mulheres HIV-soropositivas, cadastradas no Centro de Orientação e Aconselhamento Sorológico (COAS), do município de Guarapuava/PR. As pacientes foram submetidas ao protocolo estabelecido de atendimento ginecológico que inclui anamnese e exame ginecológico com o rastreamento das neoplasias intracervical.

De acordo com Ferreira, *et al.*, (2006), as 30 pacientes estudadas, portadoras do HIV, estavam em uso de uma ou mais drogas anti-retrovirais, independente do tempo de uso, até a data da colpocitologia oncótica cervical. O material citológico coletado foi encaminhado ao Laboratório Central do Estado do Paraná e os resultados desses exames retornaram ao COAS, que providenciou cuidados as pacientes com indicação de NIC.

Ainda, segundo os autores, a idade das mulheres do grupo de estudo variou entre 18 a 65 anos, sendo a média de 40 anos. Quanto à escolaridade, 60% possuíam ensino fundamental incompleto, indicando baixo grau de instrução. Nesse estudo, Ferreira, *et al.*, (2006), notaram que 59% não possuíam parceiros fixos, sendo 21% separadas e 38% solteiras. Conforme dados obtidos na pesquisa de Ferreira, *et al.*, (2006), das 30 pacientes em estudo, encontraram 03 casos (10%) de NIC no grupo investigado, sendo duas (6,6%) diagnosticada NIC I e uma (3,3%) NIC II. Dentre essas mulheres com NIC, em 02 (66,6%) havia indicação de infecção pelo HPV.

Embora o HPV não tenha sido motivo do estudo de Ferreira, *et al.*, (2006), os autores da pesquisa chamam atenção para o alto índice de mulheres portadoras de NIC com indicação de HPV. Ferreira, *et al.*, (2006), encontraram o índice de 10% de NIC e 66% de HPV nas pacientes deste estudo.

Segundo Ferreira, *et al.*, (2006), vários estudos têm evidenciado que em mulheres portadoras de HIV, observa-se maior incidência de infecção do trato genital inferior pelo HPV. Os autores concluíram que os dados desse estudo sugerem que o HPV, assim como o NIC, são patologias agravadas pelos vírus HIV e alertam quanto um maior con-

tingente de mulheres portadoras do vírus a merecer cuidados na detecção do NIC como o rastreamento e tratamento precoce das doenças relacionadas com a síndrome (AIDS). Pelo estudo realizado, pelas pesquisas descritas e pela literatura pesquisada, observou-se que o HPV tem uma associação com o câncer cervical uterino. Daí, a importância da realização da colpocitologia oncótica que é ofertada a população feminina pelo Sistema Único de Saúde (SUS), bastando para isso que se faça o exame preventivo (Papanicolaou), bem como o procedimento histopatológico, quando necessário, permitindo; assim, a detecção e diagnóstico precoce e o tratamento das lesões cervicais.

CONCLUSÃO

O estudo descritivo retrospectivo da população estudada foi realizado junto aos resultados citológicos registrados nos prontuários de 106 pacientes do sexo feminino, no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, do qual fizeram parte mulheres que procuraram o Hospital Universitário Sul Fluminense, Vassouras, RJ, para submeterem a colpocitologia oncótica.

De acordo com esse critério, os prontuários foram submetidos à análise onde foram levantados dados para avaliar a incidência da infecção pelo HPV e paralelamente foi realizada uma revisão bibliográfica com o objetivo de abordar o vírus do HPV e suas possíveis conseqüências em relação à associação da infecção pelo papiloma vírus humano – HPV, no desenvolvimento de câncer e lesões precursoras em cérvix uterina.

Assim, conclui-se que dos 106 laudos citológicos, 82 (77,4%) estão associados à ocorrência de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), como, também, este estudo evidência que a ocorrência da infecção é elevada em todas as faixas etárias estudadas e, de acordo com a revisão bibliográfica pesquisada, certos tipos de HPV são capazes de induzir lesões para neoplasias de diferentes graus.

Faz-se necessária à realização de ações integradas e voltadas à Saúde da Mulher conjuntamente com a questão do câncer ginecológico.

É importante considerar que a Educação em Saúde tem uma grande contribuição na área de prevenção, como meio de evitar lesões e agressões ao colo uterino e doenças sexualmente transmissíveis (DSTs); através de campanhas de esclarecimento e adesão aos programas de acompanhamento e prevenção, associadas à eficácia de métodos diagnósticos são as chaves para o sucesso de novas estratégias para combater o câncer cervical.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me ajudado e iluminado meu caminho mais uma vez.

Agradeço ao meu Professor Orientador Gustavo Lopes Peixoto por toda atenção e dedicação.

Agradeço a minha mãe, Maria Madalena, por sempre estar presente me apoiando e dando força.

REFERÊNCIAS

- ALBRING, L.; BRENTANO, J. E. & VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 38, n. 2, p. 87-90, 2006.
- ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. *Revista Brasileira de Saúde Pública*. São Paulo, v. 25, n. 4, agosto de 1991.

- BUFFON, A. ; CIVA, M. & MATOS, V. F. Avaliação de lesões intra-epiteliais escamosas e microbiologia em exames citológicos realizados em um laboratório de Porto Alegre, RS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.38, n. 2, p. 83-86, 2006.
- CAMPOS, R. R.; MELO, V. H.; DEL CASTILHO, D. M. ; Nogueira, C. P. F. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, v. 27, n. 5, 2005.
- CARVALHO, M. O. O. CARESTIATO, F. N.; PERDIGÃO, P. H. Human Papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Brazilian Journal of infection diseases*, v. 9, n. 5, p. 398-404, 2005.
- DO CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. *Revista Saúde e Biologia*, v.2, n. 1, p. 29-31, 2007.
- ELEUTÉRIO, Jr. J.; CAVALCANTE, R. J.; SANTIAGO, O. R.; SILVA, S. D. Citologia oncótica, colposcopia e histologia no diagnóstico de lesões epiteliais do colo uterino. *NewsLab*, edição 63, 2004.
- ELEUTÉRIO, Jr. J.; GIRALDO, C. P.; GONÇALVES, K. A. Marcadores imunohistoquímicos de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 18(1): 62-65, 2006.
- FERREIRA, H.; LALA P. R. E.; BORBA, P. K. Rastreamento de neoplasia intracervical em um grupo de mulheres portadoras de vírus da imunodeficiência humana. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, 12(3): 7-12, setembro de 2006.
- GOMPEL, C.; KOSS, L. G. Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclinicas, 1 ed., 1997, p. 80-86.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 15/11/2007.
- LIMA, C. A.; PALMEIRA, J. A. V.; CIPOLLOTTI, R. Fatores associados ao câncer do colo do útero em Própria, Sergipe, Brasil. *Cadernos de Saúde pública*. Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, outubro de 2006.
- MARANA, H. R. C.; DUARTE, G.; QUINTANA, S. M. Fatores de risco para recidiva após tratamento de lesões provocadas pelo HPV no trato genital feminino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, v. 21, n. 4, 1999.
- MARKOWITZ, L. E.; DUNNE, E. F.; SARAIYA, M.; LAWSON, H. W.; CHESSON, H.; UNGER, E. R. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine. *Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices*, v. 56, n. 2, 2007.
- MEDEIROS, V. C. R. D.; MEDEIROS, R. C.; MORAES, L. M.; FILHO, J. B. M.; RAMOS, E. S. N.; SATURNINO, A. C. R. D. Câncer de colo do útero: Análise Epidemiológica e Citopatológica no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n.4, p. 219-221, 2005.
- MOTTA, E. V. da; FONSECA, A. M. da; BAGNOLI V. R.; RAMOS, L. de O.; PINOTTI, J. A. Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo, v. 47, n.4, outubro/dezembro de 2001.
- MURTA, E. F. C.; LOMBARDI W.; BORGES, L. S.; SOUZA, M. A. H.; ADAD, S. J. Frequência da infecção pelo Papilomavírus Humano em mulheres com ectopia cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, v. 21, n. 8, 1999.
- NORONHA, L. V.; CRUZ M. E.; NAUM, P. C.; MELLO, W.; NORONHA, R.; SILVEIRA, I.; MENDES, S.; VILLA, L. Papilomavírus humano em mulheres submetidas a colpocitologia oncótica. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* ,18(2): 130-136, 2006.
- NORONHA, L. V.; NORONHA, R.; CARMONA, B.; MACEDO, A. L.; CRUZ, M. E.; NAUM, C.; MELLO, W.; VILLA, L. Papilomavírus humano (HPV) em mulheres com citologia oncótica dentro dos limites da normalidade. *Dst – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* , 17(1): 49-55, 2005.
- NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACEDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus Humano associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 3, 1999.
- OLIVEIRA, L. H. S.; RODRIGUES, E. V. M.; LOPES, A. P. T. A. S. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 genes. *São Paulo Medical Journal*, v. 121, n. 2, p. 67-71, 2003.
- PINTO, A. P.; TÚLIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo, v. 48, n. 1, janeiro/março de 2002.

PN-DST/AIDS. Disponível em <http://www.aids.gov.br>. Acessado em 15/11/2007.

RAMA, C. H.; ROTELLI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; OLIVEIRA, E. Z.; ALDRIGHI, J. M.; NETO, C. M. Detecção sorológica de anti-HPV 16 e 18 e sua associação com os achados do papanicolau em adolescentes e mulheres jovens. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 52, n. 1, 2006.

SEBASTIÃO, A. P. M.; NORONHA, L. de; SCHEFFEL, D. L. H.; GARCIA, M. J.; CARVALHO, N. S. de; COLLAÇO, L. M.; BLEGGI-TORRES, L. F. Estudo das atipias indeterminadas em relação à prevalência e ao percentual de discordância nos casos do Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero do Paraná. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, v.40, n.6, dezembro de 2004.

SHEETS, E. E. *The cervix*, 7 th ed., 1999, p.93-103.

SILVA, T. T. da; GUIMARÃES, M. de L.; BARBOSA, M. I. de C.; PINHEIRO, F. G.; MAIA, A. F. Identificação de tipos freqüentes e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Rio de Janeiro, v.28, n. 5, maio de 2006.

SILVA, O. J. R.; REIS, F. F. A.; RUSSOMANO, B. F.; FIALHO, V. A. C. S.; GRIN-SZTEJN, B.; ATHAYDE, M. P. J. M. Lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau em pacientes infectados pelo HIV. DST – *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, 15(4) 22-26, 2003.

SILVEIRA, L. M. S.; SILVA, H. A.; PEREIRA, I. P.; PINHEIRO, V. M. F. Critérios citomorfológicos para o diagnóstico de HPV e sua relação com a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n. 2, p. 129-133, 2005.

STIVAL, C. O.; LAZZAROTTO, Y. B. R.; VARGAS, V. R. A. Avaliação comparativa da citopatologia positiva, colposcopia e histologia: Destacando a citopa-

tologia como método de rastreamento do câncer do colo do útero. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.37, n. 4, p. 215-218, 2005.

TEIXEIRA, J. C.; SANTOS, C. C.; DERCHAIN, S. F. M.; ZEFERINO, L. C. Lesões induzidas por papilomavírus humano em parceiros de mulheres com neoplasia do trato genital inferior. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Rio de Janeiro, v. 21, n. 8, 1999.

TUON, F. F. B.; BITTENCOURT, M. S.; PANICHI, M. A.; PINTO, A. P. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológico e colposcópico em relação ao exame histológico na identificação das lesões intra-epiteliais cervicais. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 48, n. 2, 2002.

VALDERRAMA, A. J.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R.; PIVA, S.; CONSO-LARO, M. E. L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de Papilomavírus Humano. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, 2003.

ZIMMERMANN, J. B.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Associação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, n. 6, p. 345-351, 2006.

ZONTA, M. A.; MARTINS, C. A. S.; ABEL, M. N. C. Correlação entre colpocitologia inflamatória e detecção do papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase (PCR). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n. 2, p.103-105, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Tainá Carneiro de Castro Monte

Rua Visconde de Irajá, 188/202

CEP. 22410-000 Rio de Janeiro - RJ

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 de sensibilidade de *Salmonella* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais*

Profile of sensitivity of *Salmonella* sp. of water environment for commercial antimicrobials and the hydroalcoholic extracts of medical plants*

Caroline Evelin Nascimento Kluczynik¹, Joelly Holanda de Souza², Josman Dantas Palmeira², Sávio Benvindo Ferreira², Rossana Miranda Pessoa Antunes³, Thúlio Antunes de Arruda³, Maricelma Ribeiro Morais⁴ & Raïssa Mayer Ramalho Catão³

RESUMO - Doenças de veiculação hídrica é a causa de grandes problemas de saúde pública no mundo, sendo a *Salmonella* sp. um representante dessa classe de microrganismos patogênicos. A contaminação dos recursos hídricos vem acompanhada de outro fator agravante, o crescente aparecimento de cepas de *Salmonella* sp. resistentes aos antimicrobianos comerciais, demonstrando a importância de encontrar novas substâncias com atividade antimicrobiana. Este estudo objetivou verificar a sensibilidade de 28 cepas de *Salmonella* sp., isoladas de um rio impactado por esgotos em Campina Grande (PB), a antimicrobianos comerciais e analisar a atividade antimicrobiana dos seguintes extratos hidroalcoólicos: *Rosmarinus officinalis*, *Ximenia americana*, *Anadenanthera colubrina*, *Astronium uruncleura*, *Sprychnobendron absringens* e *Anarcadium occidentale*. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande/PB). Na metodologia, foram usados métodos de difusão em placas com meio sólido Mueller-Hinton. Observou-se, diante dos antimicrobianos comerciais, 6 (21,5%) cepas resistentes à Tetraciclina, seguida por Cotrimoxazol com 1 (3,6%) cepa resistente. Nenhuma resistência foi verificada à Amicacina, Amoxicilina, Aztreonam, Cefalotina, Cefoxitina, Cloranfenicol, Gentamicina, Imipenem e Lomefloxacina. Dos seis extratos hidroalcoólicos testados, todos apresentaram atividade antimicrobiana às cepas de *Salmonella* sp. testadas, apenas o *Rosmarinus officinalis* mostrou pouca atividade, sendo eficaz a 4 (14,3%) das cepas testadas.

PALAVRAS-CHAVE - *Salmonella* sp., antimicrobiano, extratos hidroalcoólicos.

SUMMARY - Diseases of running water is the cause of major public health problems in the world, and the *Salmonella* sp. is a representative of this class of pathogenic microorganisms. Contamination of water resources is accompanied by other aggravating factor, the growing emergence of strains of *Salmonella* sp. resistant to commercial antimicrobial, demonstrating the importance of finding new antimicrobial activity substances. This study aimed to verify the sensitivity of 28 strains of *Salmonella* sp., isolated from a river impacted by sewage in Campina Grande (PB), the commercial antimicrobials and examine the antimicrobial activity of the following hydroalcoholic extracts: *Rosmarinus officinalis*, *Ximenia americana*, *Anadenanthera colubrina*, *Astronium uruncleura*, *Sprychnobendron absringens* and *Anarcadium occidentale*. The analyses were performed in the Laboratório de Microbiologia in the Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande / PB). In methodology, it was used methods of dissemination in plates with solid middle Mueller Hinton. It was observed in front of commercial antimicrobials, 6 (21.5%) strains resistant to Tetracycline, followed by Cotrimoxazol with 1 (3.6%) resistant strain. No resistance was found to Amikacin, Amoxicillin, Aztreonam, Cefalotin, Cefoxitin, Chloramphenicol, Gentamicin, Imipenem and Lomefloxacin. Of the six hydroalcoholic extracts tested, all showed the antimicrobial activity of *Salmonella* sp. strains tested, only the *Rosmarinus officinalis* showed little activity, with the effective 4 (14.3%) of the strains tested.

KEYWORDS - *Salmonella* sp., antimicrobial, hydroalcoholic extracts.

INTRODUÇÃO

Doenças de transmissão hídrica são aquelas em que a água atua como veículo de agentes infecciosos. Os microrganismos patogênicos atingem a água através de excretas de pessoas ou animais infectados, causando problemas principalmente no aparelho intestinal do homem. Essas doenças podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos²⁷.

Salmonella sp. é uma enterobactéria cuja forma de contágio está associada a alimentos e água contaminados com fezes infectadas⁴. Segundo Smith *et al.* (2008), é primariamente transmitida pela via oral-fecal. Outros modos de transmissão zoonótica incluem o contato direto com animais de produção, animais silvestres, animais de companhia, particularmente gatos e tartarugas. Sendo que, a doença mais comum causada pela *Salmonella* sp. é a salmonelose, cujos sintomas são febre, diarreia, náuseas e vômitos e tendem a aparecer cerca de 24h após a ingestão

de água ou alimentos contaminados¹¹.

Um aspecto de extrema importância tem sido o aumento expressivo da ocorrência de amostras multiresistentes aos antimicrobianos. Nos países desenvolvidos, esta ocorrência tem sido particularmente associada ao emprego de doses terapêuticas e subterapêuticas de antibióticos nos animais, ou para a promoção de crescimento (aditivo de rações); enquanto nos países em desenvolvimento, o aumento da resistência tem sido relacionado ao uso de antimicrobianos na medicina humana, tanto nos hospitais, como na comunidade²⁹.

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas¹².

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisado-

Recebido em 29/05/2008

Aprovado em 07/01/2010

*Laboratório de Análises Clínicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB, Brasil.

¹Aluna de Graduação, Enfermagem/UEPB. ²Alunos de Graduação, Farmácia/UEPB. ³Prof. Dr.º do Deptº de Farmácia/UEPB. ⁴Prof. Ms. Deptº de Farmácia/UEPB.

res estudam a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias⁶.

Neste contexto, inúmeras pesquisas vêm comprovando cientificamente o aumento de estirpes de bactérias resistentes a antimicrobianos, a exemplo da *Salmonella* sp.^{14,18}, bem como a atividade antimicrobiana de algumas plantas frente a cepas bacterianas, a exemplo do alecrim (*Rosmarinus officinalis*)¹, ameixa-do-mato (*Ximenia americana*)¹⁹, angico (*Anadenanthera colubrina*)²⁰, aroeira (*Astronium uruncleura*)⁷, barbatimão (*Sprychnobendron abscringens*)¹³ e cajueiro (*Anarcadium occidentale*)¹³, analisadas neste estudo.

O uso tradicional dos extratos hidroalcoólicos analisados neste trabalho, mostra que eles possuem várias atividades terapêuticas, dentre elas: anti-séptica e antiespasmódica (alecrim)⁸; antifúngica (ameixa-do-mato)¹⁹; antidiarreica e cicatrizante (angico)⁶; antioxidante e antimicrobiana (aroeira)⁷; antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (barbatimão)¹⁶; estimulante dos centros medulares, além de eficácia nas astenias (cajueiro)¹⁷.

O presente trabalho objetiva conhecer *in vitro* o perfil de sensibilidade de cepas de *Salmonella* sp. a onze antibióticos comerciais, usados rotineiramente na clínica médica, bem como verificar a atividade antimicrobiana de seis extratos hidroalcoólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas nos Laboratórios de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), onde funciona o Laboratório de Pesquisa em Atividades Antimicrobianas.

Plantas utilizadas

As plantas utilizadas foram selecionadas, adquiridas e identificadas pelos professores Thúlio Antunes de Arruda e Rossana Miranda Pessoa Antunes, na cidade de Campina Grande-PB, Brasil.

Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados seguindo-se as recomendações da Farmacopéia Brasileira 2ª edição (1959), procedeu-se no Laboratório de Fitoterapia da UEPB.

Os Extratos hidroalcoólicos analisados foram: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), ameixa-do-mato (*Ximenia americana*), angico (*Anadenanthera colubrina*), aroeira (*Astronium uruncleura*), barbatimão (*Sprychnobendron abscringens*) e cajueiro (*Anarcadium occidentale*).

Microrganismos

Foram utilizadas neste estudo 28 cepas de *Salmonella* sp. da coleção do Laboratório de Microbiologia do departamento de Farmácia da UEPB. Estas cepas foram isoladas de um rio do Estado da Paraíba, cuja nascente encontra-se entre os Municípios de Pocinhos e Puxinanã, atravessa a cidade de Campina Grande, dirigindo-se posteriormente à Barra de Santana.

Meios de Cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos, os seguintes meios de cultura: Ágar Mueller-Hinton e Caldo Brain Heart Infusion, todos da marca BBL- Difco Laboratoires Ltda.

Preparo e Padronização de Inóculos Bacterianos

Durante a realização do ensaio as cepas foram mantidas em Ágar Mueller-Hinton (AMH). Antes dos testes as cepas cultivadas foram repicadas duas vezes consecutivas para os meios mencionados e incubadas a 37°C por 24h.

Suspensões de cada microrganismo foram preparadas pelo método de suspensão direta de colônias (3 a 5 colônias semelhantes) em 2mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e ajustadas ao padrão 0,5 da escala de McFarland para conter cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL²⁰.

O inóculo bacteriano foi semeado aproximadamente 15 a 20 minutos após sua preparação².

Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma)

Para a análise dos antimicrobianos, o inóculo microbiano foi semeado na superfície das placas de Petri de 150 x 90 mm estéril, contendo Ágar Mueller Hinton, com auxílio de swabs estéreis (BAUER *et al.*, 1966). Onde foram dispostos os 11 antimicrobianos testados: Amicacina 30µg (AMI), Amoxicilina 10 µg (AMO), Aztreonam 30µg (ATM), Cefalotina 30µg (CFL), Cefoxitina 30µg (CFO), Cloranfenicol 30µg (CLO), Cotrimoxazol 25µg (SUT), Gentamicina 10µg (GEN), Imipenema 10µg (IPM), Lomefloxacina 10µg (LMX) e Tetraciclina 30µg (TET), todos da marca Cecon.

Após 30 minutos à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando-se o formação de halos de inibição de crescimento bacteriano.

Screening

Os ensaios do *screening* para verificar a presença de atividade antimicrobiana nos extratos frente às cepas selecionadas, foram efetuados pelo método de difusão em ágar, utilizando os extratos puros.

Para cada microrganismo testado, 1mL de inóculo padronizado foi transferido para placa de Petri de 90 x 15 mm estéril e misturado homogeneamente com 20 mL de AMH fundido a 45°C. Após solidificação, cavidades de cerca de 6mm de diâmetro foram perfuradas no ágar (seis por placa), para as quais foram transferidos 50 µL de cada amostra de extrato. Após 30 minutos à temperatura ambiente as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Simultaneamente aos testes, foram realizados controle de viabilidade das cepas frente ao solvente utilizado na preparação dos extratos.

Leitura e interpretação do screening

Após a incubação, procedeu-se a leitura das zonas de inibição de crescimento, que foi realizada com régua com precisão de 0,5 mm. Foram utilizados os seguintes parâmetros para interpretação dos resultados obtidos: ausência de halo de inibição = inativo; presença de halo de inibição ≥ 8 mm ativo^{31, 24, 5}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão sumarizados os resultados do perfil de sensibilidade das cepas estudadas frente aos antimicrobia-

nos comercias e na tabela 2 os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos.

No teste de disco-difusão, relacionado ao perfil de sensibilidade de cepas de *Salmonella* sp. a antimicrobianos comerciais, observou-se que dentre as 28 cepas testadas, 7 (25%) foram resistentes pelo menos a um dos antimicrobianos testados e verificou-se ainda que 6 cepas (21,5%) foram resistentes à tetraciclina e 1 cepa (3,6%) apresentou resistência ao cloranfenicol (Tabela 1).

Os resultados mostraram que todas as cepas foram sensíveis à ampicilina, amoxicilina, aztreonam, cefalotina, cefoxitina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem e lomefloxacina.

Dados de literatura mostraram valores semelhantes aos encontrados neste estudo, Morais *et al.* (2003), analisando a resistência de cepas de *Salmonella* sp. isoladas de ambiente aquático, observou que o maior número de cepas resistentes foi à tetraciclina (17% do total das cepas testadas) e ao cotrimoxazol (2,8% das cepas testadas). Tavechio *et al.* (2004), em São Paulo, estudando a frequência e resistência antimicrobiana de *Salmonella entérica*, observou que todas as cepas foram sensíveis à aztreonam, cefalotina, cefoxitina e imipenem, resultados estes que estão de acordo com os encontrados neste trabalho.

Diante dos resultados, é evidente que o tratamento apropriado para as infecções causadas por enterobactérias deve ser individualmente monitorado para sensibilidade do organismo ao antibiótico. Muitos destes bacilos são altamente resistentes aos antibióticos, devido à produção de β -lactamases e outras enzimas que modificam as drogas. Esses organismos sofrem conjugação de modo freqüente, adquirindo plasmídeos (fator R) que medeiam múltipla resistência às drogas¹⁵.

Com os dados obtidos nesta pesquisa é possível constatar que 25% das cepas testadas apresentaram resistência a um dos antimicrobianos e destacou-se a tetraciclina como antimicrobiano ineficaz à 21,5% das cepas testadas. Esse fato, provavelmente, está relacionado ao emprego das tetraciclínicas como um dos antibióticos mais utilizados como aditivo na alimentação de animais, onde o seu uso resulta em um significativo ganho de peso animal; entretanto problemas de saúde, como resistência antibiótica, podem ocorrer a seus consumidores²⁸. Estas observações podem ser válidas para este estudo, visto que as cepas de *Salmonella* sp. analisadas foram isoladas de ambiente aquático, coletadas de uma ampla região geográfica que compreende vários trechos de um mesmo rio, não se podendo excluir a possibilidade das cepas serem provenientes de humanos ou animais^{15, 28}.

A tabela 2 apresenta a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, ameixa-do-mato, angico, aroeira, barbatimão e cajueiro, observando-se que todos eles apresentaram atividade para as cepas testadas, sendo os extratos de ameixa-do-mato, angico, aroeira, barbatimão e cajueiro eficazes para todas as cepas (28/100%), enquanto que o extrato de alecrim apresentou atividade apenas para 4 (14,3%) das cepas testadas, inclusive com os menores halos de inibição de crescimento.

Dos extratos utilizados neste trabalho, existem relatos na literatura de suas atividades antimicrobianas que corroboram com os resultados obtidos. Um estudo realizado por Orlando (2005), com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de barbatimão frente às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, demonstrou atividade para todas as cepas testadas, resultados

semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Omer *et al.* (2003) apud Morais *et al.* (2005), comprovou experimentalmente a atividade fungicida da ameixa-do-mato ao estudar plantas medicinais utilizadas por índios.

Os resultados obtidos para o extrato hidroalcoólico de alecrim corroboram com as citações realizadas por Sousa e Conceição (2007), que relatam pouco ou nenhum efeito deste extrato contra bactérias Gram-negativas. Em relação à atividade antimicrobiana do angico, resultado semelhante ao obtido por esta pesquisa foi descrito por Viana (2003) que ao analisar o extrato de *Anadenanthera macrocarpa*, comprovou sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *Salmonella* spp.

O extrato de cajueiro confirmou os dados obtidos por Gonçalves *et al.* (2005), produzindo atividade antibacteriana a todas as cepas testadas, assim como também, o extrato de aroeira que foi ativo em todas as cepas testadas, corroborando com, o estudo de Degaspari e Wasczynskvj (2004).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os extratos hidroalcoólicos de alecrim, ameixa-do-mato, angico, aroeira, barbatimão e cajueiro possuem potencial antimicrobiano, o que torna promissor seu estudo para elaboração de medicamentos fitoterápicos. Entretanto, são necessários estudos complementares para isolar as substâncias responsáveis por esta atividade antimicrobiana.

CONCLUSÕES

Observou-se que a maioria das cepas de *Salmonella* sp. foi sensível aos antimicrobianos comerciais. Destacando-se, porém, a Tetraciclina como o antimicrobiano menos eficaz, por apresentar o maior número de cepas resistentes.

Todos os extratos analisados apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *Salmonella* sp. testadas. Entretanto, o extrato de alecrim demonstrou ser o menos ativo.

TABELA I
Perfil de sensibilidade de cepas de *Salmonella* sp. aos antimicrobianos

Cepas Identificadas	ANTIMICROBIANOSTESTADOS/DIÂMETRO DOS HALOS (MM)											
	AMI	AMO	ATM	CFL	CFO	CLO	SUT	GEN	IPM	LMX	TET	
01	24 (S)	26 (S)	30 (S)	24 (S)	26 (S)	28 (S)	28 (S)	24 (S)	30 (S)	30 (S)	26 (S)	
03	22 (S)	24 (S)	28 (S)	20 (S)	28 (S)	28 (S)	29 (S)	18 (S)	30 (S)	28 (S)	26 (S)	
14	22 (S)	28 (S)	30 (S)	26 (S)	28 (S)	24 (S)	24 (S)	18 (S)	30 (S)	>30 (S)	0 (R)	
16	26 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	26 (S)	>30 (S)	28 (S)	>30 (S)	
21	24 (S)	29 (S)	>30 (S)	27 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	12 (R)	
23	20 (S)	28 (S)	>30 (S)	28 (S)	29 (S)	>30 (S)	>30 (S)	20 (S)	>30 (S)	>30 (S)	12 (R)	
31	22 (S)	29 (S)	>30 (S)	29 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	21 (S)	>30 (S)	>30 (S)	29 (S)	
38	27 (S)	28 (S)	30 (S)	28 (S)	28 (S)	27 (S)	>30 (S)	28 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	
54	22 (S)	28 (S)	>30 (S)	24 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	26 (S)	
61	22 (S)	28 (S)	>30 (S)	28 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	
63	22 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	>30 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	
69	22 (S)	27 (S)	30 (S)	26 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	22 (S)	30 (S)	>30 (S)	29 (S)	
70	23 (S)	28 (S)	>30 (S)	26 (S)	29 (S)	>30 (S)	>30 (S)	22 (S)	>30 (S)	>30 (S)	12 (R)	
90	22 (S)	26 (S)	26 (S)	24 (S)	26 (S)	26 (S)	28 (S)	20 (S)	29 (S)	28 (S)	26 (S)	
92	26 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	26 (S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	
104	20 (S)	25 (S)	26 (S)	24 (S)	26 (S)	28 (S)	28 (S)	18 (S)	26 (S)	28 (S)	26 (S)	
109	23 (S)	26 (S)	>30 (S)	28 (S)	28 (S)	28 (S)	30 (S)	22 (S)	30 (S)	30 (S)	28 (S)	
111	22 (S)	30 (S)	>30 (S)	26 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	22 (S)	>30 (S)	>30 (S)	12 (R)	
125	21 (S)	29 (S)	>30 (S)	28 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	22 (S)	>30 (S)	>30 (S)	28 (S)	
126	22 (S)	28 (S)	>30 (S)	28 (S)	28 (S)	>30 (S)	30 (S)	21 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	
129	26 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)	
144	22 (S)	27 (S)	30 (S)	26 (S)	28 (S)	26 (S)	26 (S)	22 (S)	>30 (S)	30 (S)	28 (S)	
148	26 (S)	28 (S)	>30 (S)	29 (S)	29 (S)	>30 (S)	>30 (S)	22 (S)	>30 (S)	>30 (S)	29 (S)	
153	24 (S)	28 (S)	>30 (S)	26 (S)	30 (S)	30 (S)	30 (S)	24 (S)	30 (S)	>30 (S)	30 (S)	
188	24 (S)	28 (S)	>30 (S)	26 (S)	28 (S)	>30 (S)	23 (S)	24 (S)	>30 (S)	>30 (S)	2 (R)	
190	26 (S)	26 (S)	>30 (S)	26 (S)	28 (S)	28 (S)	26 (S)	23 (S)	30 (S)	>30 (S)	28 (S)	
197	20 (S)		28 (S)	25 (S)	27 (S)	27 (S)	28 (S)	20 (S)	29 (S)	>30 (S)	28 (S)	
228	20 (S)	28 (S)		29 (S)	25 (S)	26 (S)	30 (S)	0 (R)	20 (S)	>30 (S)	24 (S)	26 (S)
Nº Total de Cepas (28)	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	22	
% Sensibilidade (100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(96,5%)	(100%)	(100%)	(100%)	(78,5%)	

Legenda: AMI = Ampicilina, AMO = Amoxicilina, ATM = Aztreonam, CFL = Cefalotina, CFO = Cefoxitina, CLO = Cloranfenicol, SUT = Cotrimoxazol, GEN = Gentamicina, IPM = Imipenem, LMX = Lomefloxacina e TET = Tetraciclina. S = sensível; R = resistente.

TABELA II
Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente às cepas de *Salmonella* sp

Cepas Identificadas	Extratos hidroalcoólicos /DIÂMETRO DOS HALOS (MM)					
	A	B	C	D	E	F
01	18	16	8	17	13	14
03	17	15	0	15	18	13
14	18	12	0	17	18	18
16	17	16	0	18	14	16
21	17	16	0	16	15	16
23	18	15	0	19	17	17
31	16	15	0	17	16	17
38	17	18	0	17	19	18
54	17	16	0	15	16	15
61	18	16	0	19	13	19
63	11	9	0	11	18	9
69	17	15	0	16	15	16
70	18	17	11	18	15	12
90	17	15	9	16	14	16
92	17	15	0	16	16	17
104	17	15	0	17	15	16
109	19	16	11	18	15	18
111	17	17	0	14	14	15
125	16	15	0	16	15	16
126	17	15	0	17	16	18
129	17	16	0	17	16	17
144	15	9	0	16	14	17
148	17	14	0	16	17	18
153	17	15	0	16	16	17
188	16	12	0	14	14	14
190	18	16	0	16	15	17
197	16	17	0	15	18	17
228	17	14	0	17	17	14
Nº Total de Cepas (28) % Sensibilidade (100%)	28 (100%)	28 (100%)	4 (14,3%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)

Legenda: A = barbatimão (*Sprynchobendron abscondens*); B = ameixa-do-mato (*Ximenia americana*); C = alecrim (*Rosmarinus officinalis*); D = cajueiro (*Anacardium occidentale*); E = angico (*Anadenanthera colubrina*) e F = aroeira (*Astronium urunclera*).

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLLI, A. R.; BARBOSA, A. M.; NASCIMENTO, A. C.; NASCIMENTO, P. F. ET AL. - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev. Bras. Farmacogn., 17 (1): 108-113, 2007.
- BAUER, A. W.; KIRBY, E. M.; SHERRIS, J. C. & TURK, M. - Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. Am. J. Clin. Patol: 45 (4): 493-496, 1966.
- CARNEIRO, M. R.; OLIVEIRA, S. S.; RODRIGUES, D. P.; ARAGÃO, A. C.; SILVEIRA, B. D. & CÂNDIDO, A. L. - Isolamento e identificação de *Salmonella* enteritidis em surto de doença gastroentérica na cidade de Aracaju, SE, Brasil. Rev. Hig. Alim., 17 (104): 184-185, 2003.
- CARVALHO, A.A.T.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S.; MELO, A.F.M.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C. & SENA, K.X.F.R. - Atividade Antimicrobiana in vitro de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas. Acta Farmaceutica Bonaerense, 21(4): 255-258, 2002.
- CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes. 2007. 126 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- CATHARINO, E. L. Angico. Disponível em: <http://www.cotianet.com.br/jornalatuante/mat051.htm>. Acessado em: 21 de abril de 2008.
- DEGASPARI, C. H. & WASZCZYNSKJVJ, N. - Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*). 2004. 104 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DUARTE, M. C. - Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Multiciência, Campinas, n. 7, 2006.
- FARMACOPÉIA Brasileira, 1959. 2 ed., São Paulo: Siqueira.
- FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T. - "Multiplex PCR" identification of the atypical and monophasic *Salmonella* enterica subsp. Enterica serotype 1,4, [5], 12: i: - in São Paulo State, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 46 (2): 77-80, 2004.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. 1 ed. São

- Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.
- FURLAN, M. R.; JORGE, A. O.; PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C. & UENO, M. - Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev. Saúde Públ., 38 (2): 2, 2004.
 - GONÇALVES, A. L.; ALVES, A. F. & MENEZES, H. - Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Bio., 72 (3): 353-358, 2005.
 - HOHMANN, E. L. Cepas de *Salmonella* são resistentes a alguns antibiótico. Disponível em: http://www.lincx.com.br/lincx/cientificos/medicos/molestias/cepas_salmonella.asp. Acessado em: 09/04/2008.
 - JAWETZ, E. & LEVINSON, W. Microbiologia Médica e Imunologia. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632 p.
 - MAMBER, D. Barbatimão. Disponível em: <http://www.portalfarmacia.com.br/farmacia/principal/conteudo.asp?id=554>. Acessado em: 21 de abril de 2008.
 - Medicina Alternativa de A a Z. Frutas na medicina alternativa, cajueiro. Disponível em: <http://www.ednatureza.com.br/frutas.htm>. Acessado em: 21 de abril de 2008.
 - MORAIS, M. R.; CATÃO, R. M. & CEBALLOS, B. S. - Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonellas* isoladas de ambiente aquático. RBAC, 36 (2): 79-82, 2004.
 - MORAIS, S. M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A. & MAGALHÃES, E.F. - Plantas Mediciniais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. Rev. Bras. Farmacogn., 15 (2): 169-177, 2005.
 - NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 20 (2): 197-A5, 2000.
 - NEDER, R. N. - Microbiologia – Manual de Laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138 p.
 - OMER, M. E. F. & EHNIMA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. Fitoterapia, 74: 122-126, 2003 apud MORAIS, S. M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A. & MAGALHÃES, E.F. - Plantas Mediciniais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. Rev. Bras. Farmacogn., 15 (2): 169-177, 2005.
 - ORLANDO, S. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão). 2005. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Franca, Franca.
 - SAKAR, M. K.; TAMER, A. V. & TOKOUR, S. Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. Fitoterapia, 59 (1): 49-52, 1988.
 - SOUZA, T. M. P. & CONCEIÇÃO, D.M. - Atividade Antibacteriana do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) Rev. Cienc. Veter., 5: 7-13, 2007.
 - SMITH, K. et al. *Salmonella* DT104. Disponível em: <http://www.vet.uga.edu/VPP/NSEP/Brazil2002/salmonella/port/transmission.htm>. Acessado em: 09/04/2008.
 - Superintendência de Água e Esgotos de Ituiutaba. Doenças de veiculação hídrica. Disponível em: <http://www.saeituiutaba.com.br/?arq=101>. Acessado em: 10/04/2008.
 - TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. - Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.
 - TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. - Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.
 - VIANA, A. P. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Anadenanthera macrocarpa* e *Stryphnodendron coriaceum* frente a cepas de *Salmonella* spp. 2003. 53 p. Monografia (graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
 - WONG-LEUNG, Y. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in Chinese medicine. Fitoterapia, 69 (1): 11-16, 1988.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Caroline Evelin Nascimento Kluzynik
 Rua Manuel Alves de Oliveira, 159/303-B
 CEP: 58105-600 Campina Grande - PB

Avaliação dos efeitos do hipotireoidismo na gestação

Avaliation of hypothyroidism effects in pregnancy

Natália Barth¹; Bianca Pizzolotto da Costa¹; Fábio Kerber Slongo¹;
Mabel Cristina Nascimento¹ & Gustavo Müller Lara²

RESUMO - A gestação induz diversas alterações fisiológicas maternas, sendo uma delas a função tireoidiana. Quando há a presença de anticorpos antitireoidianos ou ingestão deficiente de iodo, as alterações aumentam ainda mais, resultando em hipotireoidismo materno e/ou fetal ocasionando complicações para a mãe e para o feto durante a gravidez. Estudos relatam que filhos de mães hipotireoidianas não tratadas durante a gravidez podem apresentar deficiências no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). É aconselhável que mulheres que possuem hipotireoidismo estabilizem a doença antes da gestação para a prevenção de maiores complicações. Devido a isto, tornam-se importante realçar o diagnóstico e o tratamento de gestantes hipotireoidianas, eliminando, desta forma, os riscos de prováveis complicações tanto para a gestante quanto para o feto.

PALAVRAS-CHAVE - Gestação, hipotireoidismo, glândula tireóide.

SUMMARY - Pregnancy induces many physiological maternal changes, being one of them the thyroid function. When there is the presence of anti-thyroid antibodies or deficient ingestion of iodine, the alterations increase even more, resulting matern and/or fetal hypothyroidism, occasioning complications for the mother and for the fetus during pregnancy. Studies report that children of mothers with untreated hypothyroidism during pregnancy can develop significant decrease in intellectual development of the offspring. We point that women with hypothyroidism stabilize their disease before pregnancy to avoid bigger complications. With this literature review we aim to show the importance of the diagnosis and treatment of pregnant women with hypothyroidism, excluding the risk of complications to the mother and the fetus.

KEYWORDS - Pregnancy, hypothyroidism, thyroid gland

INTRODUÇÃO

Mulheres em idade fértil e durante a gestação comumente apresentam distúrbios tireoidianos. FANTZ *et al.*,⁸ A frequência de hipotireoidismo na gestação varia em cada país, porém estima-se em torno de 0,3% a 25%. Em países que não possuem deficiência ingesta de iodo, a doença tireoidiana autoimune é a principal causa de hipotireoidismo. Esta doença relaciona-se com um grande número de complicações para a mãe e para o desenvolvimento dos fetos, sendo as mais freqüentes a hipertensão gestacional e o baixo peso fetal. SMALLRIDGE³²

Vários estudos têm demonstrado que a presença de anticorpos anti-tireoidianos; especialmente o anticorpo anti-tireoperoxidase, pode ocasionar complicações para a mãe e o feto, tais como a deterioração da função tireoidiana das mães e aumento de abortos espontâneos. As mulheres com abortos no primeiro trimestre de gestação apresentam elevados níveis de anti-TPO em comparação com as que não abortaram. BRENT; GLINOER; STAGNARO-GREEN^{2,11,33}

As mulheres moradoras de regiões com deficiência moderada de iodo (ingestão < 100µg/dL) têm um aumento na concentração de TSH, comparando-se com mulheres de regiões suficientes de iodo. Esse aumento apresenta-se maior nas mulheres que apresentam auto-imunidade tireoidiana, podendo levar a hipotireoidismo materno e/ou fetal. BRENT; GLINOER^{2,11} O desenvolvimento intelectual dos filhos de mães hipotireoidianas pode ser afetado se não tratado durante a gestação. SMALLRIDGE; BRENT; MORREALE^{32,2,29}

Por isso, o rastreamento precoce de gestantes com risco de hipotireoidismo deve ser inserido na rotina de hospitais e clínicas obstétricas, pois, se tratadas, pode-se atenuar ou até mesmo eliminar o risco de complicações. MANDEL *et al.*,²⁶

Mudanças na função tireoidiana durante a gestação

A gestação leva à modificações funcionais e estruturais na tireóide que simulam alterações patológicas; ela interfere

na fisiologia tireoidiana através de várias vias. O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide materno, durante o período gestacional, sofre uma série de adaptações. O feto irá desenvolver, também, seu próprio eixo e a placenta irá desempenhar um papel ativo no transporte e metabolismo do iodo e da tiroxina (T4), de modo que, no curso da gestação, há três séries de eventos atuando na fisiologia tireoidiana, resultando em efeitos complexos provisórios ou permanentes. ANDRADE *et al.*,¹

A primeira seqüência de eventos começa durante a primeira metade da gestação e se mantém até o término. Os hormônios tireoidianos são transportados no sangue através de proteínas; estas são: globulina transportadora da tiroxina (TBG), transtirretina (TBPA) e albumina. A TBG encontra-se em baixa concentração sérica; no entanto, apresenta alta afinidade com os hormônios tireoidianos sendo, responsável por grande parte do transporte de T4 (68%) e T3 (80%). Durante a gestação, a TBG aumenta de duas a três vezes, enquanto as concentrações de TBPA e albumina permanecem inalteradas; porém, a afinidade das três proteínas por T3 e T4 não é significativamente alterada. O aumento de TBG ocorre nas primeiras semanas de gestação, com pico em torno da 21ª semana, mantendo-se assim até o final desse período.

Os níveis elevados de estrógenos induzem o aumento de TBG pelo efeito combinado de aumentar a síntese hepática e também a sinalização da molécula de TBG. Os níveis de T3 e T4 aumentam durante a gestação como resultado dessas alterações, ficando nos limites superiores da normalidade. Esses níveis costumam elevar-se acentuadamente no início da gestação e mantém um platô no início do segundo trimestre em cerca de 30-100% dos valores anteriores a gestação. Os hormônios livres tendem a reduzir, com um ligeiro aumento de TSH, resultante da estimulação do eixo hipófise-tireóide. As mulheres grávidas que residem em áreas suficientes de iodo têm uma diminuição da

Recebido em 13/10/2008

Aprovado em 05/01/2010

¹Acadêmicos do curso de Biomedicina, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS – Brasil.

²Docente da disciplina de Imunologia Clínica, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS – Brasil.

Email para contato: nataliabarth@gmail.com

fração livre limitada de 10 a 15%, no entanto, em locais de restrição ou deficiência de iodo a redução é significativamente mais pronunciada. GLINOER^{10,17}

A segunda seqüência de eventos ocorre transitoriamente durante o primeiro trimestre, resultante da estimulação direta da tireóide materna por níveis elevados de gonadotrofina coriônica (hCG), que é acompanhada por uma inibição parcial do eixo hipófise-tireóide. Coincidentemente, com o pico na concentração de hCG, entre 8-14 semanas de gestação, há uma diminuição transitória no TSH sérico, GLINOER^{10,17} Aproximadamente 20% das grávidas normais apresentam níveis séricos de TSH no limite inferior da normalidade (<0,20 µUI/mL), sendo os níveis de hCG significativamente aumentados, comparando-se com os 80% restantes de grávidas com os níveis de TSH inalterados. GLINOER^{15,10}

A terceira seqüência de eventos inicia-se na segunda metade da gestação, relacionando-se com as modificações do metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos maternos. Existem três enzimas que catalisam a desidodação dos hormônios tireoidianos. A atividade da Deiodase tipo I provavelmente não é modificada na gravidez. A Deiodase tipo II é expressa na placenta e sua atividade pode representar um mecanismo homeostático para a manutenção da produção de T3 localmente quando as concentrações de T4 encontram-se reduzidas. A placenta também contém grandes quantidades de Deiodase tipo III, enzima que converte T4 para T3 reverso e T3 para T2. Por possuir uma atividade enzimática extremamente alta durante a vida fetal, esta enzima pode explicar as baixas concentrações de T3 e altas concentrações de T3 reverso, características do metabolismo hormonal da tireóide fetal. GLINOER; BURROW^{17,3}

Em conjunto, ocorrem diversas alterações no organismo materno a fim de ajustar a produção hormonal, atingindo um novo estado de equilíbrio; isso requer uma produção hormonal aumentada pela glândula tireóide materna. Uma vez atingido o equilíbrio, as demandas hormonais são mantidas até o término, provavelmente através da passagem transplacentária de hormônios da tireóide materna e aumento do *turnover* de T4 materno, sob a influência da alta atividade da deiodase tipo III.

Para gestantes de países que apresentam insuficiência de iodo, o desafio da tireóide materna é chegar a esse equilíbrio e mantê-lo até o fim da gestação. Todavia, essas alterações fisiológicas são atingidas sem dificuldade pela tireóide normal; contudo, isso não acontece quando a glândula materna está prejudicada, como ocorre na doença tireoidiana auto-imune, hipotireoidismo ou quando a gestante possui dieta pobre em iodo. GLINOER^{16,17}

Hipotireoidismo materno

A associação de hipotireoidismo com anovulação fez com que muitos médicos concluíssem que gestações complicadas por hipotireoidismo eram extremamente raras. BRENT; METSMAN^{2,27} Contudo, estudos posteriores indicam que estas mulheres, se tratadas, podem engravidar e desenvolver os fetos sem maiores complicações. BRENT; LEUNG^{2,25} O SNC fetal depende de iodo e T4 para seu desenvolvimento durante toda a gestação, sendo, desta forma, extremamente necessária a avaliação das crianças nascidas de mães com severa deficiência de iodo. CAO *et al.*⁴ demonstraram que das gestantes que receberam iodo durante o primeiro e segundo trimestre, apenas 2% de seus filhos apresentaram moderada ou severa anormalidade neurológica. Contudo, se essa suplementação for feita tardiamente durante o terceiro trimestre ou no início do pós-parto, as

anormalidades aumentam aproximadamente 9%. SMALLRIDGE; CAO^{32,4}

O hipotireoidismo materno normalmente é causado por tireoidite auto-imune ou por destruição da glândula (ablação com iodo ou cirurgia) e, raramente, por desordem hipotalâmica-hipofisária. Os efeitos do hipotireoidismo materno não tratado são muitos para as mães e para os fetos (quadro 1). SMALLRIDGE; MONTORO^{32,28} LEUNG *et al.*²⁵ acompanharam 68 mulheres com hipotireoidismo durante toda a gestação, das quais 23 apresentavam hipotireoidismo clínico e 45 subclínico. Como resultado, a prevalência de hipertensão gestacional foi elevada em ambos os grupos, sendo 22% para o clínico e 15% no subclínico, em comparação com 7,6% do grupo sem disfunção. Nos recém nascidos o baixo peso foi a complicação mais comum dos filhos de mães com hipotireoidismo clínico, sendo encontrado em aproximadamente 22%. As malformações congênicas e natimortos foram observados nas gestantes que não foram tratadas adequadamente. DAVIS *et al.*,⁶ acompanharam 18 mulheres diagnosticadas com hipotireoidismo clínico, sete dessas mulheres apresentaram pré-eclampsia e três tiveram descolamento precoce de placenta e hemorragia pós-parto. Foi observado baixo peso fetal (< 2000g) em cinco e dois natimortos. Das 12 gestantes com hipotireoidismo subclínico avaliadas, duas apresentaram pré-eclampsia e hemorragia pós-parto.

O hipotireoidismo clínico e subclínico, se não tratado, pode estar relacionado com número aumentado de abortos espontâneos. Além disso, essas mulheres apresentam frequentemente anti-TPO positivo (80% *versus* 9% das mulheres com TSH normal) e alguns estudos tem confirmado o aumento da incidência de abortos durante o primeiro trimestre de gestação, WASSERSTRUM *et al.*,³⁶ e que a reposição de T4 poderia beneficiar um pequeno grupo dessas mulheres com historia de abortos recorrentes (VAQUEIRO *et al.*,³⁴).

Vários estudos têm relatado que filhos de mães com hipotireoidismo descompensado durante a gestação podem apresentar significante decréscimo do quociente de inteligência (QI). Aproximadamente 20% dessas crianças têm níveis de QI igual ou menor que 85, mostrando, dessa forma, a importância da avaliação da função tireoidiana antes ou durante o início da gravidez. SMALLRIDGE; MORREALE; GLINOER^{32,29,14}.

Materno	Fetal
Hipertensão Gestacional	Prematuridade
Pré-eclampsia	Baixo peso ao nascimento
Descolamento prévio da placenta	Natimorto
Anemia	Sofrimento fetal
Hemorragia pós-parto	

Quadro 1. Hipotireoidismo materno: efeitos na mãe e feto

Efeitos no desenvolvimento do feto

Evidências clínicas (POP *et al.*,³¹) e experimentais (MORREALE *et al.*,³⁰) evidenciaram a importância da passagem transplacentária dos hormônios tireoidianos no desenvolvimento do feto, principalmente quando se trata de SNC. Assim é que o T4 tem sido mensurado no líquido celômico humano desde a quarta semana de gestação, CONTEMPRÉ⁵, sendo detectado no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos com agenesia ou disgenesia tireoidiana. VULSMA *et al.*,³⁵

Atualmente, existem publicações chamando atenção ao papel da condição hormonal tireoidiana materna no prognóstico neuropsicológico fetal após o nascimento. HADDOW *et al.*,¹⁸

Hipotireoidismo subclínico

O hipotireoidismo é uma condição em que se encontram elevações séricas do hormônio estimulante da tireóide (TSH) ($> 5 \mu\text{U/ml}$), na vigência de níveis séricos normais de hormônios tireoidianos. HUBER *et al.*¹⁹. O aumento dos níveis de TSH estimula a glândula tireóidea a produzir mais hormônios tireoidianos e, nestes casos, enquanto houver tecido tireoidiano responsivo, ocorrerá normalização da produção hormonal tireoidiana, caracterizando assim o hipotireoidismo subclínico. LARSEN *et al.*,²²

Na grande maioria das vezes, o quadro clínico do hipotireoidismo subclínico é pouco consistente e na gestante apresenta como complicador do fato de sua sintomatologia, na sua maioria, ser semelhante ao da gestação normal, portanto seu diagnóstico laboratorial e determinação de sua prevalência são de fundamental relevância, tendo em vista a prevenção de complicações maternas para o concepto. ANDRADE *et al.*,¹

Diagnóstico Laboratorial

A determinação sérica do TSH (invariavelmente elevado no hipotireoidismo primário) é considerada o indicador mais sensível. As concentrações de T4 livre podem estar dentro dos limites da normalidade em pacientes com hipotireoidismo subclínico, diminuindo de acordo com a gravidade do quadro. Os níveis de T3 livre podem estar ainda normais mesmo quando o T4 livre já se encontra em níveis baixos. Os níveis de T3 e T4 totais estão elevados durante a gestação devido ao aumento da concentração de TBG, não sendo úteis para o diagnóstico.

A determinação de anticorpos anti-TPO é importante na identificação de tireoidite de Hashimoto como a etiologia do hipotireoidismo, além de ser um marcador de risco das pacientes que podem desenvolver a doença durante a gravidez ou disfunção tireoidiana pós-parto. Foi relatada também a associação de anti-TPO a um risco aumentado de aborto espontâneo em aproximadamente 17% de gestantes, quando comparado com 8,4% em mulheres com anticorpos negativos. FANTZ; SMALLRIDGE; LAZARUS; GLINOER^{8,32,23,14}.

Tratamento

Mulheres portadoras de hipotireoidismo e que pretendente engravidar precisam manter um diagnóstico e tratamento prévio à gestação. É necessário manter o TSH e o T4 livre monitorados a partir do primeiro trimestre com revisão a cada 6 a 8 semanas. E, se preciso, aumentar a dose de reposição de levotiroxina (l-T4). Esse aumento da dose de reposição de l-T4 tem sido relatado por vários autores. Uma das causas que tenta explicar a etiologia do aumento da necessidade de T4 é que no primeiro trimestre ocorre o aumento da TBG, permanecendo assim até o final da gestação e durante a segunda metade da gestação há aumento do tamanho da placenta, com maior atividade da deiodase tipo III inativando os hormônios tireoidianos e, também, a expansão do volume plasmático. Tem sido sugerido que gestantes que fazem suplementação com sulfato de ferro que reduz a absorção de T4 necessitam também de aumento da dose de reposição hormonal. BRENT; DEGROOT; MANDEL^{2,7,26}.

O aumento da necessidade de l-T4 está relacionado com a etiologia do hipotireoidismo. Pacientes atireóticas por ablação cirúrgica e/ou radioiodo necessitaram aumentar a dose de reposição durante a gestação em comparação com paciente com tireoidite de Hashimoto que necessitaram de uma reposição bem menor. BRENT; KAPLAN^{2,20}.

Em pacientes em que o diagnóstico é realizado durante a

gravidez o reajuste da dose é realizado 6 semanas após o início do tratamento com a dosagem de TSH verificada a cada 6 a 8 semanas. Paciente submetidas à ressecção de tireóide para tratamento de neoplasias e com reposição de dose supra-fisiológicas de hormônios precisam de aumento da dose já no primeiro trimestre de gestação. BRENT *et al.*².

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando todos os fatos apresentados, conclui-se que é de fundamental importância o screening de mulheres grávidas com hipotireoidismo clínico e subclínico; devido a isto, fica clara a necessidade de inclusão no exame pré-natal de solicitações periódicas de TSH e T4 livre.

A gravidez gera inúmeros fenômenos fisiológicos no organismo materno, o que, adicionado de alguns fatores de predisposição, pode desencadear complicações extremamente importantes para o desenvolvimento do feto.

É importante, também, a preocupação da gestantes com seu estado de saúde, pois o interesse dela aumenta as chances de descoberta de doenças em seu estado subclínico.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE LJO, CRUZ T, DALTRO C, FRANÇA CS, NASCIMENTO AOS. Detecção do Hipotireoidismo Subclínico em Gestantes Com Diferentes Idades Gestacionais. Arq Bras Endocrinol Metab. vol 49 nº6 Dezembro 2005
2. BRENT GA. Maternal hypothyroidism: recognition and management. Thyroid 1999.
3. BURROW GN, FISHER DA, LARSEN PR. Maternal and fetal thyroid function. N Engl J Med 1994; 331: 1072-8
4. CAO XY, JIANG XM, DOU ZH, RAKEMAN MA, ZHANG ML, O'DONNELL K, MA T, AMETTE K, DELONG N, DELONG GR. Timing of vulnerability of the brain to iodine deficiency in endemic cretinism. N Engl J Med 1994; 331: 1739-44.
5. CONTEMPRÉ B, JAUNIAUX E, CALVO R, JURKOVIC D, CAMPBELL S, MORREALE DE ESCOBAR G. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1993;77:1719-22.
6. DAVIS LE, LEVENO KJ, CUNNINGHAM FG. Hypothyroidism complicating pregnancy. Obstet Gynecol 1988; 72: 108-12.
7. DEGROOT LJ, LARSEN PR, HENNESMANN G. Thyroid dysfunction in the pregnant patient. In: Glinoe D. Thyroid and its diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996.
8. FANTZ RC, DAGOGO-JACK S, LANDENSON HJ, GRONOWSKI MA. Thyroid function during pregnancy. Clin Chem 1999; 45: 2250-8.
9. FUKUSHI M, HONMA K, FUJITA K. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child [letter]. N Engl Med 1999.
10. GLINOER D, DE NAYER P, BOURDOUS P, LEMONE M, ROBYN C, VAN STEIRTEGHEM A, KINTHAERT J, LEJEUNE B. Regulation of maternal thyroid during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1990;71: 276-87.
11. GLINOER D, DELANGE F, LABOUREUR I, DE NAYER PH. Maternal and neonatal thyroid function at birth in the area of marginally low iodine intake. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75: 800-5.
12. GLINOER D, FERNANDEZ-SOTO ML, BOURDOUX P, LEJEUNE B, DELANGE F, LEMONE M, KINTHAERT J, ROBJIN C, GRUN JP, DE NAYER P. Pregnancy in patients with mild thyroid abnormalities: maternal and neonatal repercussions. J Clin Endocrinol Metab 1991; 73: 421-7.
13. GLINOER D. Management of hypo-and hyperthyroidism during pregnancy. Growth Horm IGF Res 2003; 13: S45-S54.
14. GLINOER D. Potential repercussions for the progeny of maternal hypothyroxinemia during pregnancy. Thyroid 2000; 10: 59-62.
15. GLINOER D. The regulation of thyroid function in pregnancy pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. Endocrinol Rev 1997; 18: 404-3.
16. GLINOER D. The thyroid in pregnancy: a European perspective. Thyroid Today 1995.
17. GLINOER D. What happens to the normal thyroid during pregnancy? Thyroid 1999.

18. HADDOW JE, PALOMAKI GE, ALLAN WC, WILLIAMS JR, KNIGHT GJ, O'HEIR CE. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 1999;341:549-55.
19. HUBER G, STAUB JJ, MEIER C, MITRACHE C, GUGLIELMETTI M, HUBER P. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of TSH, thyroid reserve and thyroid antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002.
20. KAPLAN MM. Monitoring thyroxine treatment during pregnancy. *Thyroid* 1992.
21. KLEIN RZ, HADDOW JE, FAIX JD, BROWN RS, HERMOS RJ, PULKKINEN A, MITCHELI ML. Prevalence of thyroid deficiency in pregnant women. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 41-6.
22. LARSEN PR, DAVIES TF, HAY ID. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, editors. *Williams textbook of endocrinology*, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p.389-516.
23. LAZARUS JH, PARKES AB, HALL R, ADAMS H, Premawardhana. influence of postpartum thyroiditis and antiTPO antibodies on symptomatology in the postpartum period. *J. Endocrinol.* 1993; 137: 208-10.
24. LEUNG AS, MILAR LK, KOONINGS PP, MONTORO MM, MESTMAN JH. Perinatal outcome in hypothyroid pregnancies. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 349-53.
25. LEUNG AS, MILLAR LK, KOONINGS PP, MONTORO M, MESTMAN JH. Perinatal outcome in hypothyroidism complicating pregnancy. *Obstet Gynecol* 1988; 72: 108-2
26. MANDEL SJ, BRENT GA, LARSEN PR. Levothyroxine therapy in patients with thyroid disease. *Ann Intern Med* 1993; 119: 492-502.
27. MESTMAN JH, GOODWIN TM, MONTORO MM. Thyroid disorders of pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24: 41-71.
28. MONTORO MN. Management of hypothyroidism during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40: 65-80.
29. MORREALE DE ESCOBAR G, OBREGÓN MJ, ESCOBAR DEL REY F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3975-87
30. MORREALE DE ESCOBAR G, OBREGÓN MJ, RUIZ DE OÑA C, CALVO R, ESCOBAR DEL REY F. Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy, responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 1991;129:2663-73.
31. POP VJ, BROUWERS EP, VADER HL, VULSMA T, VAN BAAR AL, DE VIJLDER JJ. Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf)*2003;59(3):282-8.
32. SMALLRIDGE RC. Hypothyroidism and pregnancy. *Endocrinologist* 2002; 12: 454-63.
33. STAGNARO-GREEN A, ROMAN SH, COBIN RH, EL-HARAZY E, ALVAREZ-MARFANY M, DAVIES TF. Detection of at risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA* 1990; 264: 1422-5.
34. VAQUERO E, LAZZARIN N, DE CAROLIS C, VALENSISE H, MORETTI C, RAMANINI C. MILD thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 204-8.
35. VULSMA T, GONS MH, DE VIJLDER JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med* 1989;321:13-6.
36. WASSERSTRUM N, ANANIA CA. Perinatal consequences of maternal hypothyroidism in early pregnancy and inadequate replacement. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Natália Barth
Rua Emilio Hanschild
CEP. 70525-180 Novo Hamburgo - RS

TEAC

Título de Especialista em Análises Clínicas

A avaliação prática do conhecimento em análises clínicas.

Valorize a sua profissão e sua carreira

Inscreva-se!!!

www.sbac.org.br

Realização:

