

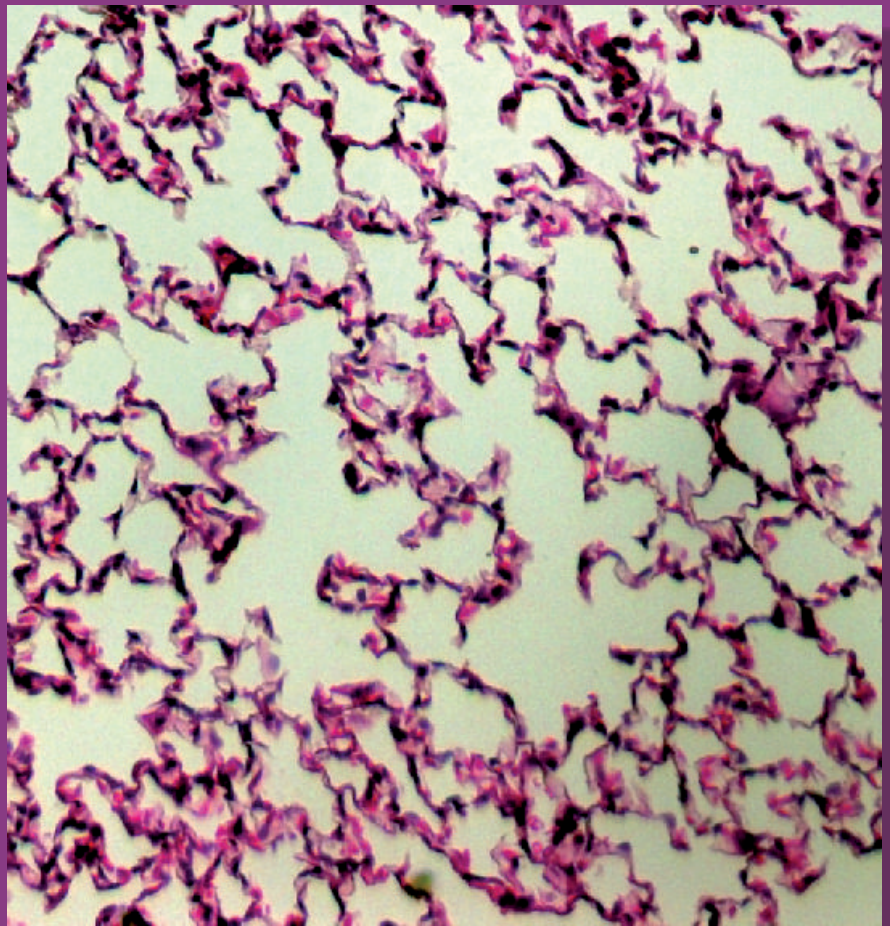
Ciência, Pesquisa e Consciência

Revista de Medicina

Volume 3 - Número 1 - Janeiro/Dezembro 2011

Ciência, Pesquisa e Consciência

Faculdades Integradas Padre Albino





§ Ciência, Pesquisa e Consciência

§ Revista de Medicina

ISSN 1984-6177

Volume 3 Número 1 p. 01-84 janeiro/dezembro 2011

Publicação com periodicidade anual, editada pelo Curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino, Catanduva-SP, tem por objetivo proporcionar à comunidade científica a publicação de artigos relacionados à área de saúde.

FUNDAÇÃO PADRE ALBINO

Conselho Administrativo

Presidente: **Antonio Hércules**

Diretoria Administrativa

Presidente: **Geraldo Paiva de Oliveira**

Núcleo Gestor de Educação: **Antonio Carlos de Araújo**

FACULDADES INTEGRADAS PADRE ALBINO

Diretor Geral: **Nelson Jimenes**

Vice Diretor: **José Carlos Rodrigues Amarante**

Coordenadora Pedagógica: **Dulce Maria Silva Vendruscolo**

CURSO DE MEDICINA

Coordenadora: **Terezinha Soares Biscegli**

EDITOR CHEFE

Maria Luiza Nunes Mamede Rosa

CONSELHO EDITORIAL

Adriana Paula Sanchez Schiaveto

Alfeu Cornélio Accorsi Neto

Ayder Anselmo Gomes Vivi

Carlos Elysio Castro Correa

Celina Santaella Rosa

Emílio Herrera Júnior

Ivan Humberto Sanches

Jorge Luis dos Santos Valiatti

José Alves de Freitas

Luciana Bernardo Miotto

Luiz Lázaro Ayusso

Manzélío Cavazzana Junior

Marino Cattalini

Nilce Barril

Raul José de Andrade Vianna Júnior

Ricardo Santaella Rosa

Terezinha Soares Biscegli

BIBLIOTECÁRIA E ASSESSORA TÉCNICA

Marisa Centurion Stuchi

CONSELHO CIENTÍFICO

André Lopes Carvalho – Professor. Livre Docente em Oncologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Antonio Carlos Leitão de Campos Castro – Livre Docente. Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Disciplina de Nefrologia. Casa de Saúde Campinas.

Antonio Carlos Lerario – Livre Docente. Universidade de São Paulo. Pós-Doutorado Universidade de São Paulo (USP) Doutorado em Endocrinologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP).

Carlos Renato Tirapelli – Doutorado em Farmacologia. Pós-Doutorado Université de Sherbrooke (USHERB), Canadá. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP-USP).

Cláudia Maria Padovan – Doutorado em Ciências. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

Cláudio Elias Kater – Doutorado Clinical Endocrinology. University of California, U.C., Estados Unidos. Pós-Doutorado. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Cristina Antoniali Silva – Doutorado. Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Grazielle Edilaine Crippa – Doutora em Farmacologia. Pós-Doutorado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

João Tadeu Ribeiro-Paes - Doutorado em Genética. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas (UNESP).

José Fernando de Castro Figueiredo – Doutorado em Medicina (Clínica Médica). Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

Marcela Bermudes – Pós-Doutorado em Anatomia Humana e Psicologia pela Universidad de Murcia, Espanha. Pós-Doutorado em Fisiologia Humana pela Universidade de São Paulo. Universidad de Murcia, Murcia - Espanha.

Mário José Abdala Saad – Livre Docente. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Doutorado em Clinical Endocrinology. University of California, U.C., Estados Unidos. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP).

Rômulo Leite – Doutor em Ciências. Faculdade de Medicina (USP), Ribeirão Preto-SP. Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

NÚCLEO DE EDITORAÇÃO DE REVISTAS

Componentes do Núcleo:

Prof. Dr. Marino Cattalini (Coordenador)

Prof^a. Dr^a. Luciana Bernardo Miotto

Prof^a. Dr^a. Virtude Maria Soler

Marisa Centurion Stuchi - Bibliotecária e Assessora Técnica

Antonio Marcio Paschoal – Técnico em Informática



C569 Ciência, Pesquisa e Consciência Revista de Medicina / Faculdades Integradas Padre Albino, Curso de Medicina. -- Vol. 3, n. 1 (jan./dez.2011) - . - Catanduva : Faculdades Integradas Padre Albino, Curso de Medicina, 2009-
v. : il. ; 27 cm

Anual.
ISSN 1984-6177

1. Medicina - periódico. I. Faculdades Integradas Padre Albino. Curso de Medicina.

CDD610

- Os artigos publicados na **Ciência, Pesquisa e Consciência - Revista de Medicina** são de inteira responsabilidade dos autores.
- É permitida a reprodução parcial desde que citada a fonte.
- Capa: Ato Comunicação
- Impressão deste periódico: Ramon Nobalbos Gráfica e Editora Ltda.
- Início de circulação: janeiro de 2009 / *Circulation start: January 2009*
- Data de impressão: novembro de 2011 / *Printing date: November 2011*



05 EDITORIAL

Terezinha Soares Biscegli

ARTIGOS ORIGINAIS

07 ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROCEDIMENTOS DE FIXAÇÃO HISTOLÓGICA PARA ANÁLISE DE ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE

COMPARATIVE STUDY OF TWO HISTOLOGICAL FIXING PROCEDURES FOR ANALYSIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED PULMONARY EMPHYSEMA

Valter Abraão Barbosa de Oliveira, João Tadeu Ribeiro-Paes, Rodrigo de las Heras Kozma, Nathalia Longhini dos Santos, Carolina Arruda de Faria, Maria José de Oliveira Ribeiro-Paes

12 ALTERAÇÕES NA MEMÓRIA E NA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA INDUZIDAS PELA NEURODEGENERAÇÃO DO HIPOCAMPO

ALTERATIONS ON MEMORY AND ON GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION INDUCED BY NEURODEGENERATION OF THE HIPPOCAMPUS

Helene Aparecida Fachim, Adriana Colsera Pereira, Wagner Ferreira dos Santos, Melina Mizusaki Iyomasa, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa

20 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS, POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS, EM MÃOS E ESTETOSCÓPIOS DURANTE A CONSULTA MÉDICA

DIVERSITY OF POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIA IN HANDS AND STETHOSCOPE DURING MEDICAL CONSULTATION

Alexandre Carlos Messias, Mirella Beni Balbino Ferreira, Manzélio Cavazzana Junior, Márcia Alcantara Santos Cavazzana

24 SAMU-192 - UNIDADE DE SUPORTE AVANÇADO: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

SAMU-192, ADVANCED UNIT SUPPORT: AN EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS

Ricardo Alessandro Teixeira Gonsaga, Izabela Dias Brugugnolli, Filipe Augusto Fornari Montanholi, Tiago Antonio Zanutto, Eleonora de Castro Bottura Neves

30 PERFIL DOS RECÉM-NASCIDOS ICTÉRICOS INTERNADOS NUM HOSPITAL-ESCOLA DE CATANDUVA-SP

ICTERIC NEWBORNS'S PROFILE HOSPITALIZED IN A TEACHING HOSPITAL, IN CATANDUVA CITY, SP, BRAZIL

Aline Regina Zöll, Ariane Cristina Zöll, Thiago Augusto Neiva Spironelli, Terezinha Soares Biscegli

37 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA

BEHAVIORAL CHANGES IN EXPERIMENTAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Nyanne Beckmann Bosaipo, Kelly da Silva, Diego Padovan, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, Claudia Maria Padovan



46 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA DOS CUIDADORES DE CRIANÇAS PORTADORAS DA SÍNDROME DE DOWN

EVALUATION OF THE QUALITY OF LIFE OF CAREGIVERS OF DOWN SYNDROME CHILDREN

Nilce Barril, Mirna Aparecida Teixeira, Roberta Machado

52 ENTEROPARASIToses EM MANIPULADORES DE DINHEIRO

ENTEROPASITOSIS IN COLLECTORS OF MONEY

Filipe Augusto Fornari Montanholi, Roberta Vieira do Valle Gonçalves, Lair Merlo, Márcia Alcântara Santos, Manzió Cavazzana Junior

57 EFEITOS DO ESTRESSE AFETIVO CRÔNICO SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO HIPOCAMPO

EFFECT OF CHRONIC AFFECTIVE STRESS ON THE GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS

Fábio Henrique Limonte, Marina Teixeira Ramalho Pereira, Melina Mizusaki Iyomasa, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO

64 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DO DISCO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DO GLAUCOMA

IMPORTANCE OF THE ANALYSIS OF OPTICAL DISC FOR EARLY DIAGNOSIS OF GLAUCOMA

Maria Elizabete Jimenes de Campos

ARTIGOS DE REVISÃO

67 COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS EM PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

INFECTIOUS COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Renato Eugênio Macchione, Fábio Macchione dos Santos, Pedro Enzo Macchione, Marcelo Ceneviva Macchione

72 CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) E O RIM

TEA SINENSIS (*Camellia sinensis*) AND THE KIDNEY

Luis Lázaro Ayusso, Vinícius Gutierrez Parise, Tiago Nogueira Spinosa

82 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO



Editorial

Terezinha Soares Biscegli*

É incontestável a importância das revistas científicas para comunicar e tornar públicos o debate e o avanço da ciência, rompendo antigos conceitos e estabelecendo novos, criando ciclos de renovação que representam uma das bases do processo científico. E é por este motivo que considero uma honra poder escrever, na qualidade de Coordenadora do Curso de Medicina, o editorial do terceiro volume da **Ciência, Pesquisa e Consciência**, da qual venho participando como membro do Conselho Editorial desde sua primeira publicação em 2009.

Tem sido gratificante acompanhar a evolução deste periódico, que desde o início conta com uma equipe altamente qualificada, apoiada pela Fundação Padre Albino e Faculdades Integradas Padre Albino, que trabalha de maneira árdua e contínua, não poupando esforços para o reconhecimento de seu valor na comunidade científica.

É fato indiscutível que o valor de uma revista científica reside na qualidade dos artigos que publica e na periodicidade dessas publicações. No concernente à periodicidade, graças ao empenho de seus organizadores, a **Ciência, Pesquisa e Consciência** tem garantido publicação anual, feito louvável para um periódico iniciante, que ainda luta por sua credibilidade e aceitação. Quanto à qualidade da informação científica, temos sido testemunhas que esta vem sendo a maior preocupação dos Editores e do Conselho Científico, pois a proliferação de títulos de periódicos nas diversas áreas do conhecimento, muitas vezes de nível incompatível com o periódico ao qual são submetidos, torna obrigatória a seleção criteriosa dos mesmos para não comprometer o prestígio da revista ou instituição.

Considerando que a qualidade e periodicidade da **Ciência, Pesquisa e Consciência** já estão garantidas, a meta para os anos vindouros é a indexação em base de dados nacionais e internacionais, que permitirá maior divulgação das informações de forma rápida e sistemática, possibilitando o avanço do conhecimento científico. Sabemos não ser tarefa das mais fáceis, mas acreditamos na competência e profissionalismo dos envolvidos para superar todos os empecilhos relativos a este processo.

Neste terceiro volume, além de artigos de revisão, estão sendo publicados os resultados de pesquisas de autores conceituados dentro e fora da instituição, que geraram trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais. Esperamos que a leitura dos mesmos, além de servir para ampliar os conhecimentos específicos das áreas de interesse, sirva também de incentivo para que outros docentes e alunos desenvolvam interesse em atuar na área de pesquisa, realizando e publicando trabalhos de boa qualidade, que enalteçam ainda mais o nome deste Curso de Medicina.

* Pediatra, Doutora em Medicina pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora e Coordenadora do Curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: terezinhabiscegli@yahoo.com.br



ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROCEDIMENTOS DE FIXAÇÃO HISTOLÓGICA PARA ANÁLISE DE ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE¹

COMPARATIVE STUDY OF TWO HISTOLOGICAL FIXING PROCEDURES FOR ANALYSIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED PULMONARY EMPHYSEMA

Valter Abraão Barbosa de Oliveira*, João Tadeu Ribeiro-Paes**, Rodrigo de las Heras Kozma***, Nathalia Longhini dos Santos****, Carolina Arruda de Faria****, Maria José de Oliveira Ribeiro-Paes*****

RESUMO

O enfisema apresenta-se, do ponto de vista fisiopatológico, como uma doença degenerativa pulmonar de caráter obstrutivo, com destruição das paredes alveolares e conseqüente aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, resultando numa limitação do fluxo aéreo e dispnéia progressiva. Na literatura, vários autores mostram a indução do enfisema em modelo animal e a análise histológica pulmonar. Neste trabalho, objetivou-se comparar dois métodos de fixação do tecido pulmonar: remoção do pulmão e perfusão prévia à remoção do pulmão. Camundongos C57Bl/6J foram separados em quatro grupos experimentais, dos quais dois grupos receberam instilação de elastase para indução do enfisema (G1 e G2) e dois grupos receberam instilação de soro fisiológico como controle (G3 e G4). Nos grupos G2 e G4, o pulmão foi previamente perfundido com uma solução tamponada de formol 4%, durante 5 minutos, antes da abertura da caixa torácica para a extração do órgão. Nos grupos G1 e G3 o pulmão foi extraído sem perfusão prévia. Após a extração, todos os órgãos foram perfundidos durante 24 horas com a mesma solução de formol. Após a fixação, os cortes pulmonares passaram pela rotina histológica, foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e seguiram para análise do diâmetro alveolar médio (Lm). Em relação aos métodos de fixação, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,001$). Esse resultado apresenta uma implicação prática importante, pois a remoção do órgão sem perfusão prévia permite uma simplificação da técnica, diminuindo o tempo de execução do procedimento de extração e fixação do tecido pulmonar.

Palavras-chave: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Enfisema pulmonar. Histologia pulmonar. Modelo animal.

ABSTRACT

Emphysema is presented, at a pathophysiological point of view, as a degenerative and obstructive lung disease, with destruction of alveolar walls and consequent increase of the airspaces distal to terminal bronchiole, leading to an airflow limitation and dyspnea. In literature, several authors showed the induction of emphysema in animal models and lung histological analysis. This study aimed to compare two methods of fixation of the lung tissue: lung removal and perfusion prior to removal of the lung. C57Bl/6J mice were divided into four groups, two of which received intranasal instillation of elastase to induce emphysema (G1 and G2) and the other two groups received intranasal instillation of saline, as control (G3 and G4). At the G2 and G4 groups, the lung was first perfused with a buffered solution of 4% formalin for 5 minutes before the opening of the chest for the extraction of the lung. In G1 and G3 groups, lung was extracted without prior perfusion. After extraction, all organs were perfused for 24 hours with the same solution of formaldehyde. After fixation, the lung sections underwent histological routine, stained with hematoxylin-eosin (HE) and followed for analysis of mean linear intercept (Lm). Regarding the methods of fixation, there were no statistically significant differences among all the groups ($p > 0.001$). This result has an important practical implication, because the simple removal of the organ without prior perfusion allows a simplification of the technique, reducing the running time of the extraction procedure and fixation of lung tissue.

Keywords: Pulmonary Disease Chronic Obstructive. Pulmonary emphysema. Pulmonary histology. Animal model.

¹ Apoio: CAPES, FUNDUNESP, Consórcio Intermunicipal do Vale do Paranapanema (CIVAP), Prefeitura e Câmara Municipal de Assis-SP.

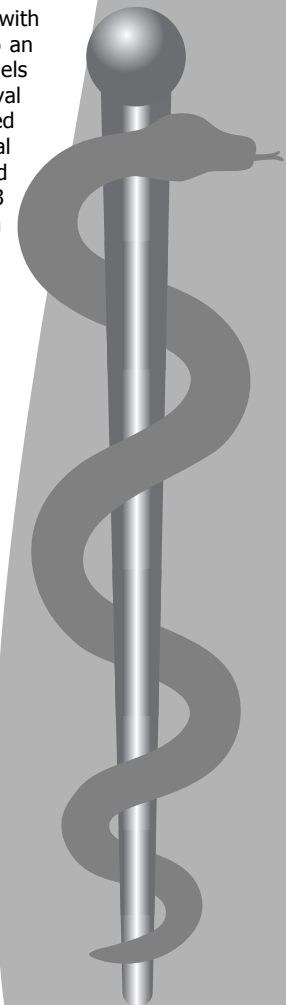
* Pós-graduando em nível de mestrado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP). Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, formados pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Assis-SP. Contato: barbosadeoliveirava@hotmail.com

** Professor Doutor da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Assis-SP. Contato: jtrpaes@yahoo.com.br

*** Pós-graduando em nível de mestrado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP). Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, formados pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Assis-SP.

**** Pós-Graduandas em nível de mestrado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP). Bacharelado em Engenharia Biotecnológica, formadas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Assis-SP.

***** Professora Doutora do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: mazepaes@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) representa um estado patológico caracterizado pela limitação crônica e progressiva das trocas gasosas. Associa-se, em geral, a uma resposta inflamatória anormal do pulmão a partículas e gases tóxicos¹. Há duas entidades nosológicas de caráter obstrutivo que compõem a DPOC, a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. O enfisema é resultante da destruição das paredes alveolares, com consequente aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal¹⁻⁶.

Entre os agentes etiológicos do enfisema, bem como, de forma geral, da DPOC, incluem-se a exposição a poluentes como partículas e gases nocivos¹. Na maioria, cerca de 90% dos casos, o tabagismo é o principal responsável pelo surgimento da doença^{1,5,7}. Uma outra parcela, menos significativa do ponto de vista epidemiológico, que corresponde a cerca de 2% dos casos, é decorrente da deficiência da enzima alfa-1-antitripsina, que caracteriza uma anomalia genética, com padrão de herança autossômico recessivo².

Atualmente, a hipótese mais aceita para explicar os mecanismos etiopatogênicos do enfisema pulmonar propõe um possível desequilíbrio entre proteases que agredem o parênquima pulmonar e antiproteases que inibem a ação das enzimas proteolíticas⁸⁻¹³.

Os estudos pioneiros em relação ao desenvolvimento do enfisema pulmonar foram realizados na década de 1960, por Gross, que obteve a patologia induzida em modelo animal a partir da instilação intratraqueal de papaína¹⁴. Esse estudo teve como consequência um reforço à hipótese do desequilíbrio entre proteases e antiproteases.

Os modelos animais de enfisema pulmonar são uma ferramenta muito importante, possibilitando estudos fisiopatológicos¹⁵⁻¹⁷, bem como, terapêuticos¹⁸⁻²³. Em geral, a indução do enfisema em animais pode ser realizada via administração intratraqueal de proteases (elastase, papaína, entre outros)^{24,25} ou por exposição à fumaça do cigarro^{16,17}. Existem também modelos animais transgênicos e/ou

“Knockouts”^{26,27}. Embora os métodos de indução de enfisema pulmonar em modelo animal não mimetizem perfeitamente o enfisema humano, representam uma abordagem metodológica de grande utilidade e aplicabilidade em estudos sobre os processos fisiopatológicos da doença²⁶.

Por outro lado, após indução do enfisema, uma série de abordagens metodológicas tem sido propostas para a análise histológica do tecido pulmonar de animais submetidos à indução experimental de enfisema. Dentre as diferentes metodologias para perfusão e fixação do tecido pulmonar, destacam-se duas abordagens: fixação do órgão, por perfusão, antes da abertura da caixa torácica para remoção dos pulmões^{19,20} e remoção do órgão sem perfusão prévia^{21,28,29}.

Não há, no entanto, na literatura, nenhum estudo prévio que compare as duas técnicas de fixação do tecido pulmonar. Considerando esses aspectos, buscou-se realizar um estudo analítico-comparativo entre os dois métodos de fixação: 1) perfusão prévia à remoção do órgão e 2) remoção do órgão sem perfusão prévia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6J, fêmeas, com idade de dois meses. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22°C e 12h - luz e 12h - escuro), receberam dieta sólida e água suplementada com Vitagold® (marca Tortuga, São Paulo e Brasil) *ad libitum*.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos: G1, G2, G3 e G4 (Tabela 1). A fim de induzir o enfisema, os grupos G1 e G2 receberam instilação intranasal de 50µl de solução contendo 4UI de elastase porcina pancreática (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO - USA). Como controle, os grupos G3 e G4 receberam instilação intranasal de 50µl de solução fisiológica (Figura 1).



Figura 1 – Instilação intranasal de elastase em camundongo da linhagem C57Bl/6J



Figura 2 – Fixação dos pulmões em aparato adaptado pela equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel, da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP), Campus de Assis

Tabela 1 – Grupos experimentais adotados no estudo

Grupos	Solução Instilada	Técnica
G 1	Elastase	Remoção e fixação
G 2	Elastase	Perfusão prévia
G 3	Solução Fisiológica	Remoção e fixação
G 4	Solução Fisiológica	Perfusão prévia

Perfusão e fixação dos pulmões

Os animais foram sacrificados 21 dias após a instilação, por aprofundamento de anestesia com Tiopenthax® (Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA - SP - Brasil) e os pulmões foram extraídos para análise histológica. Nos grupos G2 e G4 foi utilizada a técnica de perfusão prévia à extração. Esta técnica consiste na perfusão dos pulmões, com solução tamponada de formol a 4%, durante 5 minutos, antes da abertura da caixa torácica para a remoção do órgão. A traqueia foi canulada utilizando-se cateter intravenoso Angiocath 20G (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA – Juiz de Fora, MG - Brasil). Nos grupos G1 e G3 os pulmões foram removidos sem perfusão prévia com solução de formol. Após extração, todos os órgãos foram fixados na mesma solução de formol a 4% durante 24 horas em um aparato de fixação adaptado pela equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel, da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp Campus de Assis (Figura 2). Neste aparato os pulmões são mantidos à pressão constante de 20 cm H₂O de solução fixadora, que proporciona a fixação do órgão inflado de maneira uniforme, para uma melhor análise do diâmetro alveolar.

Preparação histológica

Após as 24 horas, os órgãos foram submetidos à rotina histológica e foram incubados em parafina para confecção das lâminas. Foram realizados cortes histológicos de 6µm de espessura de tecido pulmonar. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise morfométrica.

Análise morfométrica

Para cada animal, foram analisados dez campos aleatórios não coincidentes em aumento de 400 vezes com microscópio óptico de campo claro (Carl Zeiss – Carl Zeiss Microlmaging GmbH – Göttingen - Alemanha).

A análise morfológica do enfisema foi feita por intermédio do LM (em micrômetros), indicador do diâmetro alveolar médio, proposto por Weibel³⁰ em 1963, conforme está representado na Figura 3A.

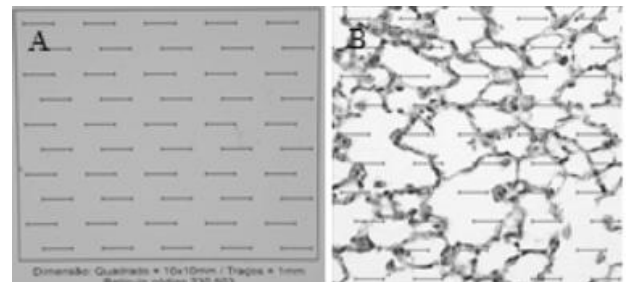


Figura 3 – (A) Retículo empregado para determinação do Lm, conforme proposto por Weibel³⁰. (B) Retículo projetado sobre uma lâmina de tecido pulmonar

Análise estatística

Os dados obtidos de LM foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) de Kruskal Wallis e *post-Hoc* de Dunn, com nível de significância 5%.

Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Assis, registro nº 013/2009.

RESULTADOS

Empregou-se, neste estudo, a análise morfométrica do parênquima pulmonar, por meio do Lm, conforme a técnica descrita por Weibel³⁰, com o intuito de avaliar a ação da elastase, bem como o efeito de dois procedimentos de perfusão pulmonar: perfusão prévia à abertura da caixa torácica para a retirada dos pulmões e remoção do órgão sem perfusão prévia. Na Figura 4 são apresentados os valores de Lm. Os grupos tratados com elastase (G1 e G2) apresentaram maior diâmetro alveolar em relação aos controles (G3 e G4), demonstrando que o modelo adotado de instilação com elastase foi eficaz para o desenvolvimento do enfisema. Na Figura 5, apresentam-se, de forma qualitativa, os mesmos resultados, mostrando que os grupos tratados com a elastase (A e B) apresentaram um aumento dos espaços aéreos quando comparados aos grupos controle (C e D).

As duas técnicas de fixação do tecido pulmonar abordadas neste estudo foram executadas em animais tratados com elastase e controles que receberam apenas solução fisiológica. Conforme apresentado na Figura 4, pode-se verificar que a aplicação das diferentes técnicas em animais controle não apresentou diferença, sendo G3 semelhante a G4. A análise entre os animais tratados com elastase demonstrou, da mesma maneira, não haver diferença entre as técnicas de fixação, sendo G1 semelhante a G2, evidenciando, portanto, que as diferentes técnicas de fixação tecidual não interferem no padrão histológico pulmonar.

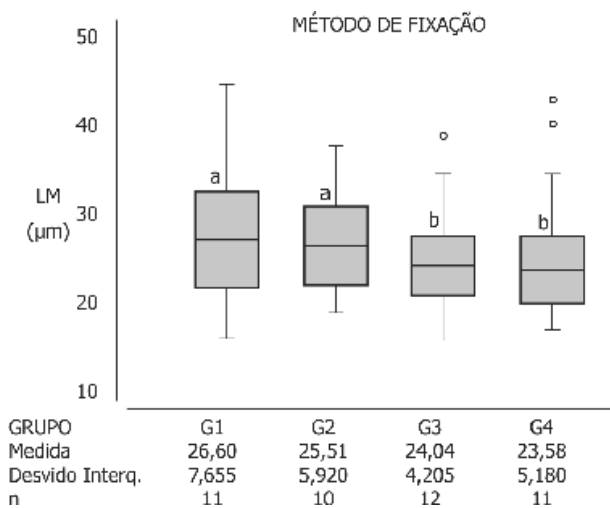


Figura 4 – Análise comparativa do diâmetro alveolar médio. G1 e G2 correspondem aos grupos instilados com elastase. G3 e G4 representam os grupos controle. Nos grupos G1 e G3 foi empregada a simples remoção dos pulmões, enquanto nos grupos G2 e G4 foi aplicada a técnica de perfusão prévia a abertura da caixa torácica. (*letras iguais indicam medianas iguais, com $p > 0,001$)

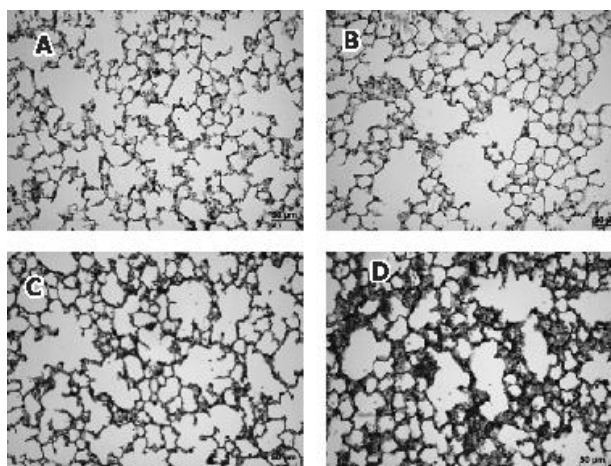


Figura 5 – Fotomicrografias em microscópio de campo claro dos cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE). (A) Grupo G1 - animais instilados com elastase e pulmões retirados sem fixação prévia; (B) Grupo G2 - animais instilados com elastase e pulmões removidos por abertura da caixa torácica, após fixação do tecido pulmonar; (C) Grupo G3 - animais instilados com solução fisiológica e pulmões retirados sem fixação prévia; (D) Grupo G4 - animais instilados com solução fisiológica e pulmões removidos por abertura da caixa torácica, após fixação do tecido pulmonar. Aumento de 200 X

DISCUSSÃO

A partir do trabalho pioneiro desenvolvido por Gross em 1965, os estudos sobre modelos animais têm contribuído decisivamente para um melhor entendimento de diferentes aspectos fisiopatológicos e etiopatogênicos do enfisema pulmonar.

Vários estudos na literatura utilizam modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por elastase. Neste trabalho, conforme apresentado na Figura 4, os animais dos grupos tratados com elastase (G1 e

G2) apresentaram um aumento no diâmetro alveolar em relação aos grupos de animais tratados com soro fisiológico (G3 e G4).

Verifica-se em geral na literatura, que a maior parte dos autores emprega a remoção dos pulmões sem realizar a fixação prévia à abertura da caixa torácica. Em contrapartida, alguns pesquisadores como Ishizawa e colaboradores e Yamada e colaboradores optam pela fixação prévia do tecido pulmonar sem, no entanto, justificar o motivo para adoção desse procedimento^{19,20}. A aplicação da perfusão prévia dos pulmões poderia estar

fundamentada no fato desta técnica manter a integridade do parênquima pulmonar frente às mudanças pressóricas resultantes da abertura da caixa torácica para remoção do órgão.

Neste trabalho, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas de fixação. Esses resultados apresentam uma implicação prática importante, pois a remoção do órgão sem perfusão prévia permite uma simplificação da técnica, diminuindo o tempo de execução do procedimento de extração e fixação do tecido pulmonar.

REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; 2009.
2. Stoller JK, Abboussouan LS. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005; 365:2225-36.
3. Mannino DM. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonol Alergol Pol*. 2011; 79(2):139-43.
4. World Health Organization. Global alliance against chronic respiratory diseases (GARD). General Meeting Report; Istanbul, Turkey. 2008 May; 30-31.
5. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med*. 2000; 343(4):269-80.
6. Jardim JR, de Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Bras Pneumol*. 2004; 30 Suppl 5:S1-S42.
7. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:822-6.
8. Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 2002; 3(1):1-8.
9. Russel RE, Thorley A, Culpitt SV. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metallo-proteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283:1867-73.
10. Russel RE, Culpitt SV, Dematos C. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 26:602-9.
11. Huang Q, Liu D, Majewski P, LC, Korn J, Young RA, Lander E, Hacohen N. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*. 2001; 294:870-5.
12. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 149:803-10.
13. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12(4):361-7.
14. Gross P, Pfitzer E, Tolker M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health*, 1965; 11:50-8.
15. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56:972-7.
16. Zheng H, Liu Y, Huang T, Fang Z, Li G, He S. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicol Lett*. 2009; 189(3):225-34.
17. Cendron SP, Battlehner C, Filho GL, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30:1241-7.
18. Fusco LB, Fonseca MH, Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R, Capelozzi V, Jatene FB et al. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. *J Bras Pneumol*. 2005; 3:34-40.
19. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett*. 2004; 556(1-3):249-52.
20. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S et al. Bone marrow-derived of Immunology. 2007; 172:1266-72.
21. Santos NL, Miranda CN, Faria CA, Marcelino MY, Kozma RLH, Barbosa-de-Oliveira VA et al. Avaliação da eficiência da terapia celular em modelo murino de enfisema em períodos definidos de tempo [monografia]. Assis (SP): UNESP; 2008.
22. Ribeiro Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *Intern J COPD*. 2011; 6:63-71.
23. Sanz-Ruiz R, Ibañes EG, Arranz AV, Santos MEF, Fernández PLS, Fernández-Avilés F. Phases I-III Clinical Trials using adult stem cells. *Stem Cells International*. 2010.
24. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha-globulin pattern of serum in alpha-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest*. 1963; 15:132-40.
25. Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34:372-80.
26. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alves-de-Moraes LBC, Faria CA et al. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009; 31:140-8.
27. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2006; 57:908-14.
28. Arantes P. Emprego de células mononucleares da medula óssea na terapêutica experimental do enfisema pulmonar [dissertação]. São Paulo: Biotecnologia USP - Instituto Butantan/IPT; 2007.
29. Faria CA, Ribeiro-Paes JT. Aplicação de células mononucleares da medula óssea na terapêutica experimental de enfisema pulmonar [monografia]. Assis (SP): UNESP; 2007.
30. Weibel E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963; 12:131-55.

ALTERAÇÕES NA MEMÓRIA E NA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA INDUZIDAS PELA NEURODEGENERAÇÃO DO HIPOCAMPO¹

ALTERATIONS ON MEMORY AND ON GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION INDUCED BY NEURODEGENERATION OF THE HIPPOCAMPUS

Helene Aparecida Fachim**, Adriana Colsera Pereira*, Wagner Ferreira dos Santos*, Melina Mizusaki Iyomasa**, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa***

RESUMO

É de amplo conhecimento o envolvimento do neurotransmissor glutamato através de seus receptores glias e neuronais nos processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos do SNC. Entretanto, esse mecanismo ainda não é completamente conhecido. Neste estudo foram avaliados, num curso temporal, as alterações na expressão das subunidades dos receptores AMPA e o comprometimento da memória espacial de ratos após lesão hipocampal induzida por microinjeção de NMDA. Ratos *Wistar* machos foram divididos em dois grupos principais, controle e NMDA e ambos receberam injeção intra-hipocampal, bilateralmente. O grupo NMDA foi dividido em três subgrupos: 24 horas, 2 semanas e 4 semanas (tempo após a lesão com NMDA no qual os animais foram submetidos ao teste comportamental e, posteriormente, sacrificados). A memória espacial foi avaliada utilizando o labirinto aquático de Morris e a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 por imuno-histoquímica. Os resultados comportamentais demonstraram o possível comprometimento da memória espacial dos animais lesados com NMDA, uma vez que estes apresentaram maiores latências (110%) para encontrar a plataforma durante os quatro dias de treino. Adicionalmente, no dia do teste final, com a retirada da plataforma, eles permaneceram menos tempo no quadrante alvo (37%) quando comparados ao grupo controle. Considerando a expressão da subunidade GluR1, a injeção de NMDA induziu aumento no número de células imunorreativas na camada CA1 nos grupos de 2 e 4 semanas pós-lesão. Para a subunidade GluR2 foi observada uma diminuição no número de células imunopositivas na camada CA1. Esses resultados sugerem que a participação do glutamato nos mecanismos hipocampais ativados pela lesão por NMDA depende: i) do tempo pós lesão; ii) da subunidade de AMPA e iii) de áreas específicas do hipocampo.

Palavras-chave: AMPA. GluR1. GluR2. Lesão hipocampal. NMDA.

ABSTRACT

It is widely known the involvement of glutamate neurotransmitter through glial and neuronal receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative processes in the CNS. However, this mechanism is still not fully known. In this study it was evaluated, in a time course, the changes on the expression of AMPA receptor subunits and on the impairment of spatial memory following the hippocampal lesion induced by NMDA microinjection. Male *Wistar* rats were divided in two main groups, control and NMDA and both received intrahippocampal injection, bilaterally. The NMDA group was divided in three subgroups: 24 hours, 2 weeks and 4 weeks (time after injury with NMDA in which the animals were subjected to behavioral test and then sacrificed). The spatial memory was evaluated using the Morris water maze and the expression of GluR1 and GluR2 subunits by immunohistochemistry. The behavioral results suggest the possible involvement of spatial memory of the animals lesioned with NMDA, as they showed higher latencies (110%) to find the platform during the four days of training. Additionally, on the final test, with the removal of the platform, they spent less time in the target quadrant (37%) when compared to control group. Considering the expression of GluR1 subunit, NMDA injection induced an increase of immunopositive cells in CA1 after lesion. For GluR2 subunit it was found a reduction of immunopositive cells. These results suggest that the involvement of glutamate on the hippocampal mechanisms triggered by NMDA depends on: i) time after lesion; ii) AMPA subunit; and iii) specific areas of the hippocampus.

Keywords: AMPA. GluR1. GluR2. Hippocampal injury. NMDA.

¹ Apoio financeiro: CAPES/PROEX, Fundação Padre Albino.

* Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Neurociências e Comportamento de Ribeirão Preto, INeC. Contato: hfachim@pg.ffclrp.usp.br

** Bióloga e auxiliar técnica do Laboratório de Neurociências do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP, Brasil.

*** Professora. Doutora na área de concentração em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado em Neurociência pela Universidade de Sheffield - Inglaterra e pela USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento-USP. Editor Chefe da Revista "Ciência, Pesquisa e Consciência", Revista do Curso de Medicina das FIPA. Docente (nível I) do conteúdo de Bioquímica do curso de Medicina das FIPA, Catanduva-SP. Contato: mlrosa.fameca@gmail.com



INTRODUÇÃO

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC, participando de importantes funções fisiológicas. Entretanto, concentrações excessivas de glutamato resultam na superestimulação de seus receptores levando ao aumento do influxo de Ca^{2+} para dentro dos neurônios e ativando um mecanismo intracelular conhecido como excitotoxicidade. Este mecanismo, que resulta na morte dos neurônios, é observado na maioria das doenças neurodegenerativas do SNC¹.

Os receptores de glutamato são divididos em dois grandes grupos, os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com seus agonistas em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). São proteínas transmembranares constituídas por um complexo de diferentes subunidades, em diferentes combinações, que conferem ao receptor maior ou menor permeabilidade ao influxo de íons².

Os receptores AMPA são constituídos pela combinação de quatro subunidades diferentes conhecidas como GluR1-4, derivadas de um único gene. Essas subunidades possuem diferentes permeabilidades ao íon Ca^{2+} , sendo a subunidade GluR2 completamente impermeável. A presença de pelo menos uma subunidade GluR2 na composição do canal é capaz de causar reduzida permeabilidade ao íon Ca^{2+} devido à presença de um aminoácido arginina carregado positivamente na região M2, ao invés de glutamina, como ocorre nas outras subunidades³. O processamento alternativo dos genes que codificam as subunidades AMPA dá origem a duas isoformas distintas destas proteínas, *flip* e *flop*, que conferem aos receptores diferentes propriedades físicas e químicas, além de distribuição heterogênea nas regiões cerebrais e expressão diferencial nos diferentes estágios do desenvolvimento^{2,4}.

Evidências mostram que algumas moléculas envolvidas com a comunicação celular no sistema nervoso maduro devem exercer papéis importantes durante o desenvolvimento, incluindo proliferação celular, migração, modificações morfológicas dos neuritos, diferenciação

neuronal e neurogênese^{5,6}. Considerando aspectos específicos da neurotransmissão glutamatérgica, estudos revelam a ocorrência de regulação na expressão diferencial das subunidades dos receptores AMPA durante o desenvolvimento, sugerindo que em diferentes estágios do desenvolvimento possa haver diferentes influências sobre a plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal e até mesmo suscetibilidade à excitotoxicidade induzida por glutamato^{6,7}.

Os processos de plasticidade e toxicidade neuronais resultam da ativação de diferentes subtipos de receptores capazes de modular o influxo de íons Ca^{2+} , como os receptores AMPA. Através destes, a entrada controlada de Ca^{2+} em quantidades determinadas levam a alterações celulares que desencadeiam respostas metabólicas, como a ativação de segundos mensageiros, ou até mesmo a ativação dos receptores NMDA dependentes de voltagem^{8,9}.

Além dos receptores AMPA, a superestimulação dos receptores NMDA também induz aumento acentuado do influxo de Ca^{2+} , uma vez que todas as subunidades que compõem estes receptores são permeáveis ao íon. Através destes, a entrada de Ca^{2+} está envolvida na regulação de vários sinalizadores celulares que pode resultar em alterações de curta ou longa duração no SNC. Este mecanismo é essencial para induzir a potenciação de longa duração (LTP) sugerindo que os receptores NMDA exercem um papel importante na formação da memória e plasticidade sináptica¹⁰.

Através de AMPA, NMDA ou cainato, a superestimulação por glutamato é seguida por rápida elevação das espécies de oxigênios reativos (ROS) resultando em morte neuronal pela ativação dos mecanismos de estresse oxidativo¹. Em modelos de indução de crise convulsiva ou em lesões induzidas pela administração de NMDA e KA, a liberação de glutamato endógeno é provavelmente responsável pela morte neuronal, uma vez que o processo desencadeado e que resulta em morte é mediado pelos receptores NMDA¹¹. O glutamato quando liberado pode se ligar a diferentes receptores, principalmente os NMDAs, uma vez que sua ativação causa mobilização do Ca^{2+} citosólico livre. O excesso de Ca^{2+} intracelular estimula enzimas cálcio-

dependentes resultando na produção excessiva de ROS, os quais levam à modificação estrutural do DNA, proteínas (formação de carbonil proteínas) e lipídeos (peroxidação lipídica), levando a danos no citoesqueleto¹².

Estudos realizados em animais expostos a danos hipocampais induzidos pela administração de NMDA revelam comprometimento da memória espacial e hiperatividade locomotora^{13,14}, além de perda substancial de tecido hipocampal e gliose¹⁴. O hipocampo de mamíferos é uma região importante para a aquisição de novas informações, está relacionado com a memória espacial e aprendizado, além de participar da regulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade¹⁵. Estudos comportamentais utilizando modelos animais são essenciais nas pesquisas que investigam as bases neurais do aprendizado e da memória. Um dos principais testes e mais utilizado nestes estudos em roedores é o labirinto aquático de Morris¹⁶.

Com o objetivo de contribuir para esclarecer a participação do glutamato através dos receptores AMPA nas alterações hipocampais que ocorrem nos processos neurodegenerativos, neste estudo analisamos a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 nas diferentes áreas do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e hilus do giro denteado-HGD) em diferentes períodos após a microinjeção local de NMDA em ratos. A eficiência da lesão foi analisada através do teste de memória espacial no labirinto aquático de Morris.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (200 a 250g) do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto-SP. Os animais foram transferidos para o biotério de manutenção do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP, acondicionados em caixa de polietileno (4 animais/caixa) e mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12hs, temperatura de 24°C ± 1°C, umidade de 55% e água e ração *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e o *Guiding Principles for Research Involving Animals e Human Beings* - Sociedade de

Fisiologia Americana (APS, 2000). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do campus da USP de Ribeirão Preto (nº do processo 10.1.619.53.3).

Cirurgia e lesão hipocampal

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais (n=6/cada): *Controle* (não-lesado); *NMDA-24 horas* (avaliado 24 horas pós-lesão, grupo 1); *NMDA-1 semana* (avaliado 1 semana pós-lesão, grupo 2); *NMDA-2 semanas* (avaliado 2 semanas pós-lesão, grupo 3) e; *NMDA-4 semanas* (avaliado 4 semanas pós-lesão, grupo 4).

Antes do procedimento cirúrgico foi administrada uma dose de 0,1 ml de sulfato de atropina (0,5mg/ml) e 15 min depois os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60mg/Kg; Agener União) acompanhada de xilazina (8mg/Kg; Calier) sendo, posteriormente, fixados em um estereotóxico (*Stoelting-Standard*). Foi realizada injeção local de lidocaína (2%), sendo logo a seguir feita uma incisão na parte superior da cabeça do animal com o objetivo de expor o crânio. Tendo como base a linha do "bregma" de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986), foram seguidas as coordenadas: AP: - 3,8; ML: - 1,4 e DV: - 2,0 para a injeção bilateral de NMDA (12mg/mL; 0,2µL) no hipocampo dorsal. Após a cirurgia a incisão foi suturada e logo em seguida foi administrado diazepam (1mg/Kg i.m.) aos animais para prevenir a ocorrência de crises convulsivas.

Uma semana após a lesão com NMDA (grupo 2), os animais foram sacrificados, seus cérebros retirados, seccionados e utilizados para avaliação histológica da lesão através da coloração de Nissl. Os grupos *NMDA-2 semanas* (grupo 3) e *NMDA-4 semanas* (grupo 4) foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris para avaliação da memória espacial.

Labirinto aquático de Morris

Os animais dos grupos NMDA-2 e -4 semanas foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris¹⁷. Este é constituído de uma piscina circular em polietileno azul (1,40cm de diâmetro e 50cm de profundidade) onde foi acrescentada água (23°C) até

uma altura de 25cm e 2.000 mL de leite para impedir a visão da plataforma. Uma plataforma branca de 9cm de diâmetro foi alocada no quadrante na região sudeste. Referências visuais (figuras geométricas: quadrado, triângulo, círculo e estrela) foram colocadas nas paredes da sala onde se encontrava o labirinto aquático. O protocolo experimental consistiu de 24 sessões de treino e uma sessão de teste. Foram realizadas seis sessões de treino por dia, por quatro dias consecutivos, nas quais foram registradas as latências de escape até a plataforma. No quarto dia, ao final do treinamento, a plataforma foi retirada da água para realização do *probe trial*. O teste consistiu em determinar a ocupação do labirinto pelo animal durante 90 segundos, verificando quanto tempo este passou em cada quadrante, na ausência da plataforma. O tempo de nado gasto pelos animais no quadrante que se encontrava a plataforma na sessão de treino (dia anterior) foi utilizado como índice de memória. Foram avaliadas a capacidade de aquisição (sessões de treino, com plataforma) e retenção (sessão de teste, um dia após os treinos, sem plataforma) das informações espaciais no Labirinto aquático de Morris, de animais controle e lesados no hipocampo.

Sacrifício, perfusão e processamento do tecido cerebral

Após o período estipulado para cada grupo e o término do teste comportamental, os animais foram profundamente anestesiados com uma dose letal de uretana e perfundidos intracardialmente através do ventrículo esquerdo. O sangue foi retirado com PBS 0,1M, pH 7,4, seguida de solução de paraformaldeído 4% (PFA 4% em PBS 0,1M, pH 7,4), 10 min./cada solução. Os encéfalos foram então extraídos e pós-fixados na mesma solução de PFA por 2 horas adicionais e em seguida crioprotetidos em sacarose 30% em PBS 0,1M por 48 a 72 horas a 4°C. Após este período os cérebros foram congelados em isopentana resfriada em gelo seco e mantidos em freezer -70°C até o seccionamento. Utilizando criostato (-18°C a -20°C), secções de 30µm de espessura foram retiradas da região hipocampal e utilizadas nos experimentos de imuno-histoquímica.

Procedimento de imuno-histoquímica

Foram utilizadas secções hipocampais em triplicata, ou seja, três secções por animal. As secções foram incubadas em uma solução contendo o anticorpo primário (Ac 1°, Millipore) anti-GluR1 (1:500) ou anti-GluR2 (1:400) diluídos em tampão A + Triton 0,3% *overnight*, à temperatura ambiente (RT). No segundo dia as secções foram incubadas com o anticorpo secundário (Ac 2°, Dako Cytomation) 1:250 em tampão A por 90' e logo em seguida incubadas com ABC (Kit Vector) 1:125 em tampão A por 2h. As secções foram lavadas em TBS 0,25M (diluído do TBS 1M) e reveladas com DAB + 3µl H₂O₂ 30%. Ao término desta etapa as secções foram diafanizadas e montadas com lamínula e Permount (Fisher).

Quantificação dos neurônios imunorreativos

A análise histológica das lâminas de imuno-histoquímica foi feita em microscópio óptico (Leica). As imagens do hipocampo de todas as secções ensaiadas nos experimentos foram capturadas bilateralmente através de uma câmera digital colorida (Leica - DFC300 FX). Foi realizada a contagem dos neurônios imunopositivos para cada proteína estudada (GluR1 e GluR2) utilizando um Programa de Análise de Imagens (Leica *QWin Plus*, Leica *Microsystems*, Alemanha).

Análise estatística

Os dados provenientes tanto do Labirinto aquático de Morris como da quantificação de células imunopositivas, para os grupos controle e lesados, foram comparados através de Análise de Variância (ANOVA) seguida de Newman-Keuls, utilizando o Programa *Graph Prism* (versão 4.0, *GraphPad Software*, EUA).

RESULTADOS

Labirinto aquático de Morris

Os resultados apresentados mostram diferenças estatisticamente significantes entre os animais controle e os animais que foram lesados com NMDA e submetidos ao teste 2 e 4 semanas após a lesão. Como esperado, a administração intra-hipocampal de NMDA resultou no declínio da função cognitiva, como demonstrado pelo

aumento das latências para encontrar a plataforma nas sessões de treino (Figura 1A) e pela redução do tempo de permanência no quadrante onde estava a plataforma (preferência pelo quadrante alvo) na sessão de teste (*probe trial*, Figura 1B), em relação aos animais controle.

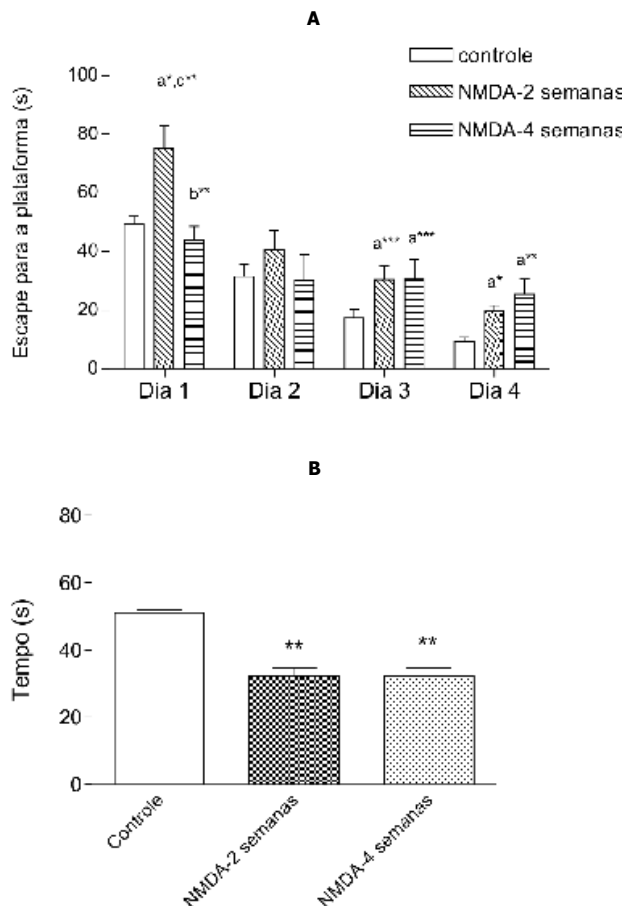


Figura 1 - (A) Latências de escape dos grupos treinados por 4 dias no labirinto aquático de Morris (Dias 1, 2, 3 e 4). **(B)** Tempo de permanência dos animais no quadrante alvo do labirinto aquático de Morris durante a sessão de teste após a retirada da plataforma (*Probe Trial*). Os valores são a média \pm EPM do período de latência para encontrar a plataforma e do tempo de permanência dos animais no quadrante. ** $p < 0,001$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls)

Na Figura 1A podemos observar que a latência de escape para encontrar a plataforma no primeiro dia de treinamento (Dia 1) dos animais do grupo NMDA-2 semanas foi estatisticamente diferente do grupo controle (50% de aumento) e do grupo NMDA-4 semanas (74% de aumento) [$F(2,10) = 8,234$; $p < 0,05$], enquanto o grupo NMDA-4 semanas não apresentou diferença em relação ao controle. No segundo dia de treinamento (Dia 2) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. Entretanto, no terceiro e quarto dias de treinamento

(Dia 3 e Dia 4, respectivamente) ambos os grupos, NMDA-2 e -4 semanas apresentaram diferenças significantes na latência de escape para encontrar a plataforma em relação ao grupo controle. Este aumento foi de 76% nos dois grupos no Dia 3 [$F(2,10) = 21,37$; $p < 0,01$] e de 110% (NMDA-2sem) e 177% (NMDA-4sem) no Dia 4 [$F(2,10) = 9,673$; $p < 0,01$]. Estes resultados revelam um desempenho inferior dos animais lesados com NMDA em relação ao do grupo controle e indicam que houve prejuízo das funções cognitivas associadas ao aprendizado e memória espacial nestes animais.

A Figura 1B mostra os resultados do *probe trial*, teste realizado após as sessões de treino quando a plataforma é retirada do quadrante alvo. Podemos observar que o tempo de permanência neste quadrante (preferência) dos animais lesados com NMDA (grupos de 2 e 4 semanas pós-lesão) foi significativamente menor do que o tempo de permanência do grupo controle [$F(2,27) = 27,23$; $p < 0,001$]. Não foi observada diferença entre os dois grupos lesados.

Os resultados comportamentais mostram a eficiência da lesão hipocampal por NMDA, uma vez que esta resultou no comprometimento da função desta área cerebral.

Imuno-histoquímica

Foram realizados os experimentos de imuno-histoquímica para a identificação das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo dos animais de todos os grupos experimentais (controles e lesados). Os resultados mostram o número de neurônios positivamente marcados para ambas as subunidades (*Immunopositive Cells* – GluR1-IC e GluR2-IC) na área CA1.

1) Expressão das subunidades GluR1 e GluR2 na área CA1 do hipocampo de ratos controles ou lesados pela microinjeção de NMDA

As Figuras 2A e B mostram a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 do receptor AMPA na área CA1 do hipocampo de ratos controles ou lesados pela

microinjeção de NMDA nesta mesma região. A densidade de células imunorreativas para ambas as subunidades é qualitativamente demonstrada na Figura 3 para todos os grupos experimentais. Podemos observar que as GluR1-IC aparecem tanto na camada densa de toda a área CA1 como também esparsas nas

regiões acima e abaixo desta camada em todos os grupos experimentais (Figura 3A-D). Entretanto, observamos que as GluR2-IC aparecem mais restritas à densa camada de corpos celulares da área CA1, exceto no grupo 2 semanas pós-lesão (Figura 3E-H), onde o padrão de distribuição é semelhante à subunidade GluR1.

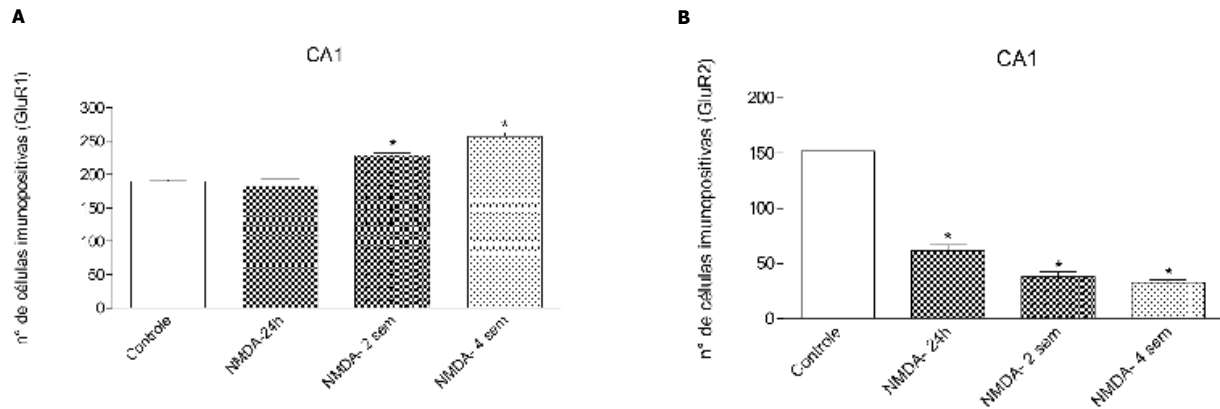


Figura 2 - Número de células imunopositivas para GluR1 presentes na camada CA1 (A) e GluR2 (B) do hipocampo nos grupos: Controle, 24 horas pós-lesão, 2 semanas pós-lesão e 4 semanas pós-lesão. Todos os valores são a média \pm EPM do número de células imunopositivas presentes em três secções de cada animal, quantificadas bilateralmente. * $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

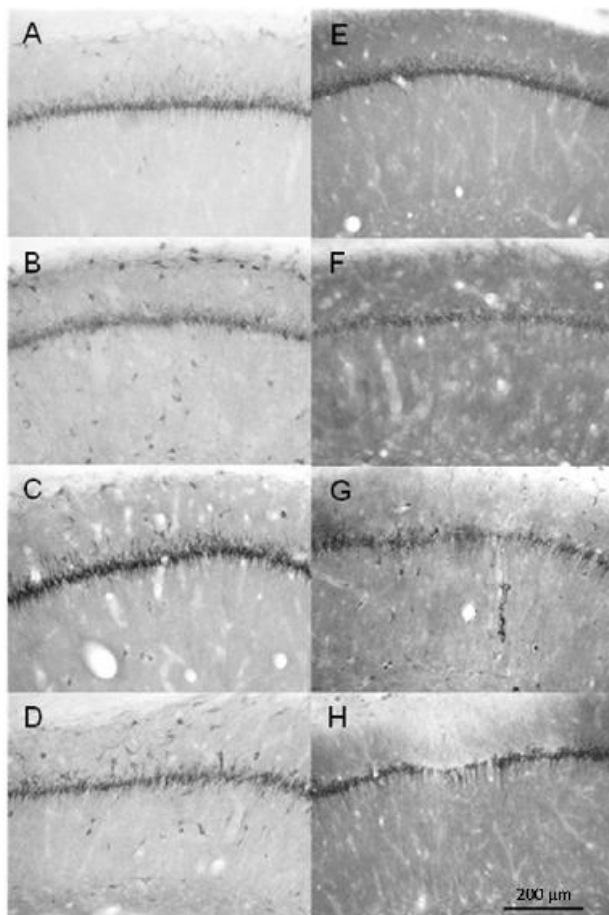


Figura 3 - Camada CA1: Imuno-histoquímica para GluR1 (A-D) e GluR2 (E-H) no hipocampo de ratos controles (A e E) ou lesados pela microinjeção de NMDA na área CA1. 24 horas pós-lesão: GluR1 (B) e GluR2 (F); duas semanas pós-lesão: GluR1 (C) e GluR2 (G) ou 4 semanas pós-lesão: GluR1 (D) e GluR2 (H).

A análise quantitativa das lâminas mostrou um aumento significativo de células imunopositivas para GluR1 na área CA1 de animais lesados com NMDA (Figura 2A). Este aumento foi observado nos grupos experimentais de duas semanas (20%, Figuras 3C e 2A) e quatro semanas pós-lesão (35%, Figuras 4D e 3A) quando estes foram comparados ao grupo controle (Figura 3A) [$F(3,23)=33,41$; $p < 0,001$]. Entretanto, o grupo 24 horas pós-lesão não apresentou diferença significativa no número de GluR1-IC em relação ao controle (Figura 3B). A análise da subunidade GluR2 está apresentada na Figura 2B, onde podemos observar que a lesão por NMDA induziu efeito contrário ao descrito para a expressão de GluR1. Uma acentuada redução do número GluR2-IC foi observada na área CA1 de todos os grupos lesados em relação ao grupo controle. Esta redução foi de 60% no grupo 24 horas pós-lesão (Figuras 3E e 2B), 75% no grupo duas semanas pós-lesão (Figuras 3F e 2B) e 78% no grupo quatro semanas pós-lesão (Figuras 3G e 2B) [$F(3,23)=213,6$; $p < 0,0001$].

A omissão dos anticorpos primários anti-GluR1 ou anti-GluR2 resultou em completa ausência de sinal (Figuras 4 A e B, respectivamente).

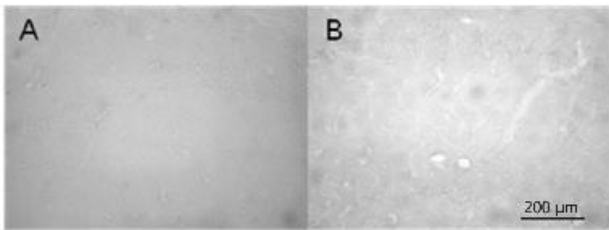


Figura 4 - Omissão do Ac 1° anti-GluR1 (A) e GluR2 (B)

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra os efeitos da lesão causada pela microinjeção de NMDA no hipocampo de ratos sobre o comprometimento da memória espacial destes animais e sobre a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 do receptor AMPA temporalmente.

Os resultados da análise comportamental mostraram o comprometimento das funções de aprendizado e memória nos animais que receberam o agonista NMDA até quatro semanas pós-lesão. Este comprometimento indica um déficit da função hipocampal induzida pela lesão, coerente com as observações histológicas. Embora os animais lesados tenham aumentado significativamente o tempo de escape para encontrar a plataforma no Labirinto aquático de Morris no decorrer dos dias em relação aos animais controle, evidenciando prejuízos nas funções de aquisição e retenção da memória espacial, nota-se que estes animais tiveram algum aprendizado porque acabaram encontrando a plataforma. Estes resultados já eram esperados, uma vez que evidências experimentais anteriores mostram que as funções de aprendizado e memória dependem essencialmente da integridade do hipocampo¹⁸. Estes pesquisadores demonstraram que a memória espacial é totalmente prejudicada (100%) quando a lesão envolve de 40 a 60% do volume total do hipocampo e que animais com lesões de 5 a 30% apresentam déficits de aprendizado, porém não deixam de aprender. Esta hipótese corrobora integralmente nossos resultados.

De acordo com o perfil clássico de distribuição dos receptores AMPA no hipocampo de ratos², os resultados obtidos neste estudo para os animais controle mostram a presença de células imunopositivas para as subunidades GluR1 e GluR2 em todas as áreas hipocampais, indicando tanto a especificidade de ligação dos anticorpos utilizados como o padrão de distribuição descrito para estas

subunidades. Considerando as alterações na expressão de GluR1 e GluR2 induzidas pela lesão por NMDA, o número de células positivamente marcadas para a subunidade GluR1 na região da área CA1 onde o NMDA foi administrado aumentou significativamente nos animais analisados 2 e 4 semanas pós-lesão, enquanto nos animais analisados 24 horas pós-lesão não foram observadas alterações. Entretanto, se neste grupo considerarmos as células distribuídas de forma esparsa acima e abaixo da camada densa de neurônios da área CA1, provavelmente serão encontradas alterações em relação ao controle.

Sabe-se que os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA são compostos por diferentes combinações de subunidades protéicas, as quais possuem diferentes permeabilidades ao íon cálcio. A subunidade GluR1 é altamente permeável enquanto a subunidade GluR2 é impermeável^{19,20} e a proporção destas subunidades na composição do receptor determina o nível de permeabilidade do receptor ao íon. Esta proporção tem sido demonstrada ser variável dependendo de vários fatores como a região cerebral, o estágio de desenvolvimento e maturação do SNC, a integridade cerebral, a natureza e intensidade de estímulos fisiológicos ou patológicos, entre outros fatores. Malinow²¹ demonstrou que especificamente a presença da subunidade GluR1 está ligada à formação de potenciais de longa duração (LTP), os quais são fundamentais para o fortalecimento das sinapses e aumento da sua eficácia, tanto durante o desenvolvimento pós-natal quanto na recuperação após uma lesão. Adicionalmente, foi demonstrado que a subunidade GluR1 dos receptores AMPA possui um papel crítico na mediação da plasticidade sináptica e na cognição^{22,23}. Entretanto, sabe-se também que um aumento excessivo na excitabilidade neuronal com elevado influxo de íons cálcio pode ter um efeito neurotóxico que leva à morte de neurônios²⁴. Desse modo, os resultados obtidos neste estudo para o aumento da expressão de GluR1 na área CA1 após a microinjeção de NMDA podem ser discutidos sob dois aspectos: i) contribuir com a neurodegeneração por permitir o influxo exacerbado de íons cálcio a níveis excitotóxicos; evidências da literatura suportam esta hipótese demonstrando que o aumento da densidade dessa subunidade está relacionado à maior suscetibilidade

à excitotoxicidade e consequente dano neuronal²⁵; ii) participar dos mecanismos de plasticidade induzidos pela lesão na tentativa de recuperar a área lesada. Inúmeras evidências da literatura também suportam esta hipótese²⁶⁻²⁸. Adicionalmente, estudos bioquímicos acerca dos receptores AMPA demonstraram que a fosforilação da subunidade GluR1 é essencial para a plasticidade sináptica e retenção da memória espacial²⁹.

Em relação à subunidade GluR2, os resultados demonstraram acentuada redução no número de células imunopositivas para esta subunidade na camada CA1 em todos os períodos pós-lesão analisados. Este resultado era esperado uma vez que esta subunidade é totalmente impermeável ao cálcio e possui um papel de modular a entrada deste íon na célula através dos receptores AMPA nos processos fisiológicos^{2,7}.

Neste estudo foi analisada a progressão da lesão induzida pelo agonista NMDA e uma visão conjunta dos resultados obtidos para a expressão de GluR1 e GluR2 nesta condição sugere que a redução de GluR2 contribui para exacerbar o influxo de cálcio através de GluR1 e desencadear os mecanismos de toxicidade e morte neuronal. Resultados semelhantes foram demonstrados em outros processos neurodegenerativos ou após um insulto no SNC como o *status epilepticus*³⁰.

Os resultados oriundos deste estudo podem contribuir com informações adicionais para o esclarecimento da participação dos receptores AMPA nos mecanismos envolvidos na evolução do processo neurodegenerativo induzido pela administração intra-hipocampal de NMDA e/ou nos mecanismos de neuroplasticidade estimulados como consequência da lesão.

REFERÊNCIAS

- Kim SM, Frank LM. Hippocampal lesions impair rapid learning of a continuous spatial alternation task. *PLoS One*. 2009;4(5):e5494.
- Rosa MLNM. Alzheimer's disease. In: Brandão ML, Graeff FG. *Neurobiology of mental disorders*. New York: Nova Publishers; 2006. p. 189-219.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 2000; 130:1007S-15S.
- Pires RS, Rebouças NA, Duvoisin RM, Britto LR. Retinal lesions induce differential changes in the expression of flip and flop isoforms of the glutamate receptor subunit GluR1 in the chick optic tectum. *Mol Brain Res*. 2000; 76:341-6.
- Ritter LM, Unis AS, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Dev. Brain Res*. 2001; 127:123-33.
- Pires RS, Real CC., Hayashi MAF, Britto LR. Ontogeny of subunits 2 and 3 of the AMPA-type glutamate receptors in Purkinje cells of the developing chick cerebellum. *Brain Res*. 2006, 1096, 11-19.
- Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV, Zukin RS. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:4157-61.
- Malenka RC. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N.Y.Acad. Sci.* 2003; 1003:1-11.
- Sheng M, Hyoung Lee S. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: major unanswered questions. *Neurosci Res*. 2003; 46(2):127-34. Review.
- Prybylowski K, Wenthold RJ. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem*. 2004; 279(11):9673-6.
- Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S9-13.
- Munhoz CD, García-Bueno B, Madrigal JL, Lepsch LB, Scavone C, Leza JC. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Dec; 41(12):1037-46. Review.
- Bardgett ME, Baum KT, O'Connell SM, Lee NM, Hon JC. Effects of risperidone on locomotor activity and spatial memory in rats with hippocampal damage. *Neuropharmacology*. 2006 Dec; 51(7-8):1156-62. Epub 2006 Aug 23.
- Bardgett ME, Boeckman R, Krochmal D, Fernando H, Ahrens R, Csernansky JG. NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Res Bull*. 2003 Apr 15; 60(1-2):131-42.
- Bertoglio LJ, Zangrossi H Jr. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. *Behav Pharmacol*. 2006 Nov; 17(7):589-96.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297:681-3.
- Talpos JC, Dias R, Bussey TJ, Saksida LM. Hippocampal lesions in rats impair learning and memory for locations on a touch-sensitive computer screen: the "ASAT" task. *Behav Brain Res*. 2008 Oct 10; 192(2):216-25. Epub 2008 Apr 20.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(40):14515-20.
- Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*. 1991; 253(5023):1028-31.
- Pellegrini-Giampietro DE. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends in Neuroscience*. 2003; 26(1):9-11.
- Malinow R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. 2003; 358:707-14.
- Malenka RC. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2003; 1003:1-11.
- Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and Synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 2002; 25:103-26.
- Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*. 1994; 16(4):279-88.
- Seifert G, Huttman K, Schramm J, Steinhäuser C. Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 Flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's Horn Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. 2004; 24(8):1996-2003.
- Grooms SY, Opitz T, Bennett MVL, Zukin RS. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *PNAS*. 1999; 97(7):3631-6.
- Rakhade SN, Zhou C, Aujla PK, Fishman R, Sucher NJ, Jensen FE. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J Neurosci*. 2008 Aug 6; 28(32):7979-90.
- Borbély S, Dóbo E, Czégé D, Molnár E, Bakos M, Szücs B, Vincze A, Világi I, Mihály A. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience*. 2009; 159:358-68.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Sandy Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*. 2003; 112:631-43.
- Grooms SY, Opitz T, Bennett MVL, Zukin RS. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *PNAS*. 1999; 97(7):3631-6.

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS, POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS, EM MÃOS E ESTETOSCÓPIOS DURANTE A CONSULTA MÉDICA¹

DIVERSITY OF POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIA IN HANDS AND STETHOSCOPE DURING MEDICAL CONSULTATION

Alexandre Carlos Messias*, Mirella Beni Balbino Ferreira**, Manzélio Cavazzana Junior***, Márcia Alcantara Santos Cavazzana****

RESUMO

No ambiente hospitalar existe uma grande variedade de espécies bacterianas associadas a infecções. As mãos dos profissionais de saúde e estudantes da área que frequentam os hospitais de ensino, quando não devidamente higienizadas, transformam-se em vias de disseminação destes microorganismos patogênicos. O objetivo do estudo foi avaliar a diversidade microbiana das mãos e estetoscópios de médicos, residentes e estudantes de Medicina, durante o atendimento a pacientes, em dois hospitais-escola de Catanduva, no estado de São Paulo, Brasil. Os primeiros resultados indicaram seis gêneros de enterobactérias comumente associadas a infecções hospitalares e encontradas com frequência em infecções do trato urinário, respiratório e feridas operatórias. Também foram encontradas bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*, relacionadas a infecções gastrointestinais, e bactérias Gram positivas das famílias *Micrococaceae* e *Streptococaceae*. Apesar da atuação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, o fato preocupa porque são os próprios profissionais que acabam se tornando uma via de transmissão.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana. Lavagem de mãos. Estetoscópios. Bactérias. Hospital.

ABSTRACT

In the hospital environment there is a wide variety of bacterial species associated with infections. The hands of health professionals and students who attend the teaching hospitals, when not properly cleaned, become avenues of spread of these pathogens. The purpose of the study was to assess the microbial diversity of hands and stethoscopes of doctors, residents and medical students, during the patient care in two hospitals-school of Catanduva, in state of São Paulo, Brazil. The first results indicated six genera of Enterobacteriaceae commonly associated with nosocomial infections and frequently found in urinary tract infections, respiratory and surgical wounds. Were also found bacteria of the genus *Shigella* and *Salmonella*, related the gastrointestinal infections, and also found Gram-positive bacteria of the families Micrococaceae and Streptococaceae. Despite the presence of infection control Hospital, the fact of concern because they are the professional that ultimately become a route of transmission.

Keywords: Bacterial diversity. Handwashing. Stethoscopes. Bacteria. Hospital.

¹ Pesquisa realizada no Laboratório de Microbiologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), de Catanduva-SP.

* Médico graduado em 2010 pelas Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

** Médica graduada em 2009 pelas Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

*** Doutor em Ciências - Biologia da relação parasita-hospedeiro, docente da disciplina de Parasitologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

**** Doutora em Ciências - Biologia da relação parasita-hospedeiro, docente da disciplina de Microbiologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: santosma@usp.br



INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de espécies bacterianas está associada a infecções humanas tanto na comunidade como no ambiente hospitalar. Os avanços tecnológicos relacionados aos procedimentos invasivos, diagnósticos e terapêuticos, e o aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos usados rotineiramente na prática hospitalar tornaram as infecções hospitalares um problema de saúde pública¹. As maiores taxas de infecção hospitalar são observadas em pacientes nos extremos da idade e nos serviços de oncologia, cirurgia e terapia intensiva. Desta forma, os dados de incidência e prevalência de infecção hospitalar obtidos em diferentes estudos, mesmo em crianças, refletem tais características populacionais e institucionais^{1,2}.

Entre profissionais médicos, estudantes de Medicina e outros integrantes de equipes médicas, as mãos não higienizadas adequadamente podem ser uma importante via de disseminação de microrganismos, uma vez que no ato do exame físico há o contato direto com o paciente, podendo ocorrer a transmissão direta destes patógenos. No Brasil, estima-se que 5 a 15% dos pacientes internados adquirem algum tipo de infecção hospitalar e este número torna-se maior conforme o aumento do tempo de internação³, sugerindo uma relação da flora ambiental e dos profissionais de saúde com estas infecções.

OBJETIVO

Avaliar a diversidade microbiana existente nas mãos e estetoscópios de médicos, residentes e estudantes de Medicina no ato do atendimento de pacientes de dois hospitais do interior do Estado de São Paulo. Este trabalho apresenta os resultados preliminares deste estudo.

MÉTODOS

Coleta do material

Foram analisados estetoscópios e/ou mãos de 46 voluntários, os quais assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), autorizando a realização do trabalho. O material foi coletado com *swab*

estéril umedecido com solução salina estéril e transportado em caldo nutriente e incubado a 37°C.

Isolamento e cultivo das bactérias

Após o crescimento, a cultura foi inoculada pela técnica de esgotamento em meio de cultura NNN sólido (10% de sangue total)⁴, onde foi realizado o isolamento. Após a obtenção e seleção das colônias, a cultura pura foi mantida em meio Agar nutriente em tubo.

Caracterização morfológica e identificação bioquímica

As amostras foram caracterizadas morfológicamente por características de colônias em meio de cultura NNN sólido (10% de sangue total)⁴ e por microscopia óptica em lâminas coradas pelo método de Gram. As Gram negativas foram testadas em sistemas presuntivos de identificação de enterobactérias (meio de Rugai com lisina - NewProv)⁵, e as Gram positivas testadas quanto a produção de catalase, fermentação de glicose e investigação de hemólise em meio de cultura NNN sólido (10% de sangue total)⁴. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) das Faculdades Integradas Padre Albino, Catanduva-SP.

RESULTADOS

Dos 46 voluntários analisados, obtivemos o crescimento de 36 amostras de mãos e 27 de estetoscópios. Destas, foram analisadas 77 colônias, entre elas foram obtidas amostras bacilos Gram negativas (16 de mãos e 20 de estetoscópios); amostras cocos Gram positivas (20 de mãos e 21 de estetoscópios) e 11 amostras bacilos Gram positivos de estetoscópios. Não foi observado nenhum isolado coco Gram negativo.

Entre os isolados Gram negativos foram observadas diferenças de tamanho e, algumas vezes, no arranjo das células (Figuras 1A e 1B). A maioria dos cocos Gram positivos, tanto de mãos quanto de estetoscópios, apresentou-se como diplococos, cocos em pequenos cachos (Figuras 1C e 1D) e pequenas cadeias, alguns isolados apresentaram cocos isolados, aos pares e tétrades.

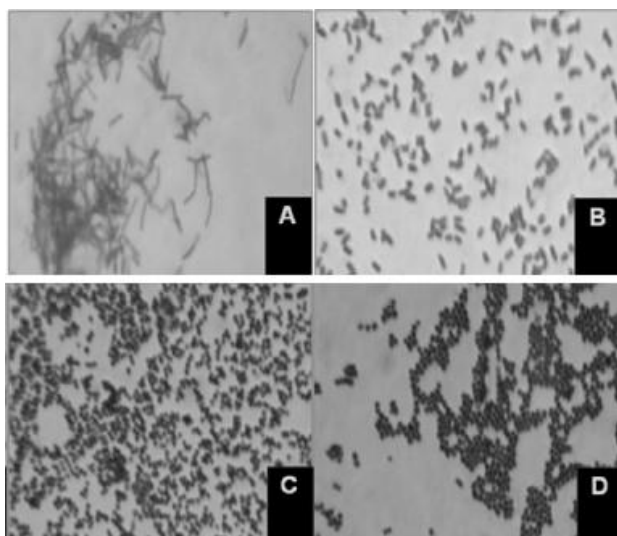


Figura 1A e Figura 1B - Bacilos Gram negativos
Figura 1C e Figura 1D - Cocos Gram positivos

Entre as amostras bacilos Gram negativos isoladas de mãos foram identificadas sete fermentadoras (Tabela 1), nove não fermentadoras de glicose e entre as isoladas de estetoscópio foram identificadas cinco fermentadoras (Tabela 2) e 15 não fermentadoras de glicose.

Tabela 1 – Aspecto bioquímico presuntivo em meio Rugai com lisina, fermentação de lactose em meio EMB e presença de catalase em amostras de bacilos Gram negativos, fermentadores de glicose, isoladas das mãos de médicos, residentes e alunos de Medicina de dois hospitais da cidade de Catanduva-SP

Amostra	Gli	Sac	Gás	H ₂ S	Ureia	Lisina	Indol	LTD	Lac	Catalase	Gen. Provável*
A6-1	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i>
A21-1	+	+	-	-	-	+	-	-	NC	+	<i>Klebsiella</i>
A22-2	+	+	-	-	-	+	-	-	NC	+	<i>Shigella</i>
A40-2	+	+	-	-	-	+	-	-	NC	+	<i>Shigella</i>
A5-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Salmonella</i>
A12-1	+	-	-	-	-	-	-	+	NC	+	<i>Enterobacter</i>
A5-1	+	-	-	-	-	-	-	+	NC	+	<i>Enterobacter</i>

Gli – glicose; Sac – sacarose; LTD – desaminase L-triptofano; Lac – lactose; NC – não cresceu; * identificação presuntiva de gênero de acordo com Levy⁶

Tabela 2 – Aspecto bioquímico presuntivo em meio Rugai com lisina e presença de catalase em amostras de bacilos Gram negativos, fermentadores de glicose, isoladas de estetoscópios de médicos, residentes e alunos de Medicina de dois hospitais da cidade de Catanduva-SP

Amostra	Gli	Sac	Gás	H ₂ S	Ureia	Lisina	Indol	LTD	Catalase	Gên. provável*
E9-2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	<i>Providencia</i>
E13-2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i>
E39-1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
E39-2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>E. coli</i>
E44-2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>E. coli</i>

Gli – glicose; Sac – sacarose; LTD – desaminase L-triptofano; * identificação presuntiva de gênero de acordo com Levy⁶

Das 20 amostras cocos Gram positivas isoladas de mãos e das 21 cocos Gram positivas isoladas de estetoscópios, a maioria apresentou reação positiva para catalase (Tabelas 3 e 4). Entre as 17 amostras isoladas de mãos positivas para catalase, seis fermentaram glicose e onze não fermentaram glicose (Tabela 3). As amostras

cocos Gram positivas isoladas de estetoscópios não foram submetidas ao teste de fermentação de glicose.

Tabela 3 – Aspecto bioquímico presuntivo de amostras coco Gram positivas, isoladas das mãos de médicos, residentes e alunos de Medicina de dois hospitais da cidade de Catanduva-SP, em relação à presença de catalase, fermentação de glicose e investigação de hemólise em BAB/sangue

Amostra	catalase	gli	Hem	Família Provável*	Gen. Provável [†]
A1-2	-	+	Não	Streptococaceae	
A4-2	-	+	Não	Streptococaceae	
A32-B2	-	+	Não	Streptococaceae	
A33-1	+	+	+	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A2-1	+	+	Não	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A33-2	+	+	Não	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A41-1	+	+	Não	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A15-1a	+	+	Não	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A15-3a	+	+	Não	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>
A30-2	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A34-1	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A3-3a	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A23-3	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A24-2	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A25-1	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A32-A1	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A39-A1	+	-	+	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A17-1	+	-	+	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A27-3	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>
A39A-2	+	-	Não	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>

Gli – Glicose; Hem – hemólise em BAB/sangue; * identificação de acordo com Levy⁶; [†]identificação de acordo com Duarte⁷

Tabela 4 - Aspecto bioquímico presuntivo de amostras coco Gram positivas, isoladas de estetoscópios de médicos, residentes e alunos de Medicina de dois hospitais da cidade de Catanduva-SP, em relação à presença de catalase

Amostra	Catalase	Família Provável*
E11-1	-	<i>Streptococaceae</i>
E35-1	-	<i>Streptococaceae</i>
E35-2	-	<i>Streptococaceae</i>
E1-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E1-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E8-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E8-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E12-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E12-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E13-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E14-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E14-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E20-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E20-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E25-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E25-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E27-A1	+	<i>Micrococaceae</i>
E27-A2	+	<i>Micrococaceae</i>
E41-2	+	<i>Micrococaceae</i>
E43-1	+	<i>Micrococaceae</i>
E43-2	+	<i>Micrococaceae</i>

* identificação de acordo com Levy⁶

DISCUSSÃO

Com base nos resultados presuntivos para enterobactérias, foi possível identificar seis gêneros de enterobactérias: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Shigella* e *Salmonella*. *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Providencia* são enterobactérias frequentemente associadas a infecções nosocomiais e encontradas com maior frequência em infecções do trato urinário, respiratório e feridas operatórias^{1,2,6,8}. A presença destas bactérias em mãos e estetoscópios da equipe de saúde é preocupante uma vez que estes profissionais

representam uma das principais fontes e vias de disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente hospitalar. Já as bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* estão associadas a infecções gastrointestinais causadas por alimentos contaminados^{5,8}. A presença de *Shigella* e *Salmonella* sugere o contato do profissional de saúde com resíduos fecais provenientes da enfermaria. Estes podem se disseminar e causar infecções graves em pacientes debilitados e mesmo em pessoas saudas, porém nestes com menor gravidade.

Além das *enterobacteriaceae*, algumas bactérias Gram positivas das famílias *Micrococaceae* e *Streptococaceae* também são importantes patógenos em potencial nos ambientes hospitalares. A presença de catalase permite separar estas duas famílias^{5,8}. Os resultados sugerem que as amostras cocos Gram positivas que apresentaram reação negativa para catalase pertençam a família *Streptococaceae* e as que apresentaram reação positiva para catalase pertençam a família *Micrococaceae* (Tabelas 3 e 4). De acordo com Duarte⁷, amostras catalase positiva e que fermentam glicose (Tabela 3) pertencem ao gênero *Staphylococcus*, enquanto as que não fermentam glicose pertencem ao gênero *Micrococcus*. Como mostrado na Tabela 3, a maioria dos isolados de mãos pertenceriam ao gênero *Micrococcus*, porém, outros testes complementares seriam necessários para confirmar nossos dados preliminares.

A prevalência de Bacilos não fermentadores Gram negativos (BNF-) só não foi maior que os cocos da família *Micrococaceae* (Gráfico 1). A presença destas bactérias nas mãos e nos estetoscópios da equipe de saúde em percentagem maior que as enterobactérias e estreptococos é preocupante, apesar de sua incidência em hospitais ser considerada pequena quando comparada a outros agentes etiológicos⁶. A preocupação é maior ainda

em relação à resistência antimicrobiana de amplo espectro que estas bactérias normalmente apresentam dentro do ambiente hospitalar. Além disso, estes BNF são capazes de causar infecções graves, especialmente em pacientes oriundos de CTI e submetidos à procedimentos invasivos^{2,6}. As perspectivas futuras do nosso estudo são: caracterizar mais detalhadamente as amostras isoladas, principalmente em relação à resistência a antibióticos, e avaliar a variabilidade genética entre elas.

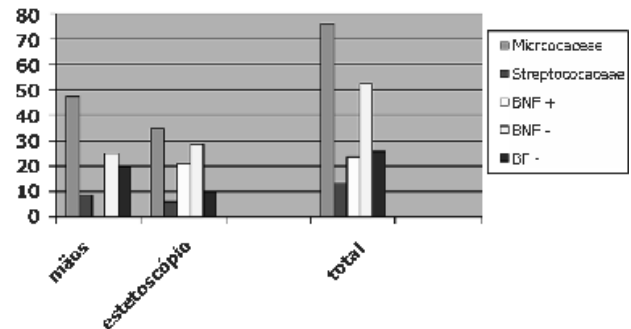


Gráfico 1 - Prevalência de bactérias das famílias *Micrococaceae* e *Streptococaceae*, de bacilos não fermentadores Gram positivos (BNF+) e Gram negativos (BNF-) e Bacilos fermentadores (BF - enterobactérias) em mãos e estetoscópios de médicos, residentes e alunos de Medicina de dois hospitais em Catanduva-SP

A maioria destas bactérias é normalmente encontrada na microbiota normal de indivíduos saudas, porém, em indivíduos imunocomprometidos pode ocasionar infecções, até mesmo letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados. Os dados preliminares deste trabalho mostram que, apesar de existir uma política de controle de infecção hospitalar (IH) e esforços pelo Centro de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) para combater as fontes e vias de disseminação de organismos causadores de IH, pode ser encontrada uma grande diversidade de bactérias nas mãos de médicos e estudantes de Medicina no ato do atendimento de pacientes das enfermarias.

REFERÊNCIAS

- Turrini RNT. Infecção hospitalar e mortalidade em hospital pediátrico [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1996.
- Gilio AE, Stape A, Pereira CR, Cardoso MF, Silva CV, Troster EJ, et al. Risk factors for nosocomial infections in a critically ill pediatric population: a 25-month prospective cohort study. *Inf Control Hosp Epidemiol*. 2000; 21:340-2.
- Medeiros EA, Bakowski E, Sassi SJ, Destra AS. Adverse events relating to antiretroviral prophylaxis for occupational accidents. *Rev Saúde Pública*. 2007; 41(2):294-6.
- Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1996.
- Rugai E, Araújo A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais gram-negativos. *Rev Instituto Adolfo Lutz*. 1968; 28:79-83.
- Levy CE. Manual de microbiologia clínica para controle de infecção em serviços em saúde. Brasília: ANVISA; 2004.
- Duarte A. Introdução à bacteriologia clínica. [acessado 2009 nov 24]. Disponível em: http://www.ff.ul.pt/paginas/aduarte/acetato/qualidade_analises.doc
- Buchanan RE, Holt JG, Lessel ER Jr, editors. Index Bergeyana. A Companion Volume to Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1966.

SAMU-192 - UNIDADE DE SUPORTE AVANÇADO: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA¹

SAMU-192, ADVANCED UNIT SUPPORT: AN EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS

Ricardo Alessandro Teixeira Gonsaga*, Izabela Dias Brugnolli**, Filipe Augusto Fornari Montanholi***, Tiago Antonio Zanutto***, Eleonora de Castro Bottura Neves***

RESUMO

O Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU-192) foi instalado no Brasil, como política de saúde, no ano de 2004. Por ser muito recente, não existem ainda muitos dados sobre o perfil dos usuários e das ocorrências, isto é, da eficiência do sistema. O objetivo desse estudo foi identificar o perfil dos atendimentos do Serviço de Atendimento Móvel de Urgência - 192 de Catanduva-SP, caracterizando os atendimentos realizados pela Unidade de Suporte Avançado e os dados epidemiológicos dos indivíduos atendidos (idade, gênero, entre outros). Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo, transversal, retrospectivo e epidemiológico. Foram utilizadas as informações contidas no banco de dados da central de regulação médica referente aos atendimentos realizados de novembro de 2005 a dezembro de 2008. Nesse período, foram registradas as saídas de 89.407 equipes de atendimento, onde a Unidade de Suporte Avançado foi regulada para 4.201 pacientes (4,7%). Catanduva-SP foi o município que mais solicitou o serviço (94,7%) e os horários de pico foram das 10h às 13h e das 19h às 21h. Os agravos agudos por enfermidades clínicas representam maior número de saídas, seguidos pelas causas externas, a maioria dos pacientes foram encaminhados à rede hierarquizada e os principais procedimentos realizados no local também foram analisados e relacionados quanto ao gênero do paciente. Ainda que na fase pré-hospitalar não se reverta um quadro grave, a rapidez da chegada à cena e, posteriormente, ao hospital, bem como as intervenções iniciais apropriadas previnem o agravamento do quadro e o surgimento de novas lesões. Na microrregião de Catanduva-SP, a equipe de atendimento avançada é regulada em número inferior a necessidade, devendo-se ao déficit no treinamento dos médicos reguladores.

Palavras-chave: Serviço de pré-hospitalar. Ambulâncias. Epidemiologia.

ABSTRACT

The Mobile Emergency Care Service -192 was installed in Brazil, as health policy, in 2004. It is very recent, there aren't yet many data about the users profile and occurrences and the system efficiency. The aim of this study was to understand the profile of the visits of Mobile Emergency Care Service - 192, Catanduva-SP, characterizing the care provided by Advanced Unit of Support and epidemiological data of individuals assisted. We used the information in the central database of medical regulation referring to calls made from November 2005 to December 2008. During this period, it was necessary output 89,407 service teams (any vehicle), however the Advanced Unit of Support has been regulated for 4,201 patients (4.7%). Catanduva-SP was the city that most requested the service (94.7%) and peak times were 10am to 1pm and 7pm to 9pm. Acute health problems for clinical disease representing a larger number of exits followed by external causes, most patients were referred to the hierarchical network and the major procedures performed on site were also analyzed and related to gender of the patient. While in the pre-hospital care does not revert to a severe, the rapid arrival on the scene and the hospital as well as the initial appropriate interventions prevent the worsening and the emergence of new lesions. In microregion Catanduva-SP, the team advanced care is regulated less than the need, and this is because of the deficit in the training of medical regulators.

Keywords: Pre hospital service. Ambulances. Epidemiology.

¹ Trabalho desenvolvido pelo curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP, com subvenção do Núcleo de Pesquisa.

* Professor nível III das Coordenadorias do Conhecimento em Cirurgia e Emergências Médicas do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA). Mestrando pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Contato: novo02@uol.com.br

** Graduanda em Medicina pelas Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

*** Graduados em Medicina pelas Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.



INTRODUÇÃO

No Brasil, o serviço de atendimento pré-hospitalar começou o seu desenvolvimento no início da década de 1990, voltado principalmente para o atendimento de vítimas de traumas e implantado de forma muito heterogênea, apenas nas grandes cidades¹. Em 2003, foi lançado o *Plano Nacional de Atendimento à Urgência e Emergência*, através da Portaria nº 1864/GM do Ministério da Saúde, o qual iniciou uma reformulação desse serviço que passou a ser denominado Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU), responsável pelo atendimento de outras áreas, além da clínica cirúrgica e dos pacientes vítimas de trauma propriamente dito². A implantação ocorreu oficialmente no ano de 2004³, tendo por princípio base ser um serviço de atendimento pré-hospitalar móvel que visa o socorro imediato de vítimas e seu encaminhamento ao serviço pré-hospitalar fixo ou hospitalar, com o objetivo de diminuir a morbimortalidade deixadas pelas lesões e traumas⁴.

A estruturação do SAMU-192 propõe um modelo de assistência padronizado que funciona com uma central de regulação, com discagem telefônica gratuita e de fácil acesso (linha 192); há regulação médica regionalizada, hierarquizada e descentralizada, portanto, é capaz de atender, dentro da região de abrangência, todo enfermo, ferido ou parturiente em situação de urgência ou emergência, e transportá-los com segurança e acompanhamento de profissionais da saúde até o nível hospitalar do sistema. Nesse modelo, há uma normalização para a composição das equipes de socorro, segundo complexidade, regulando os tipos de unidades móveis que serão eventualmente deslocadas e suas atribuições e recursos. Existem protocolos para atendimento nas situações de múltiplas vítimas, além de ferramentas operacionais regulares (mapa de área de atuação que identifica os pontos de apoio das unidades básicas e das unidades de maior complexidade; grade de referência e contra-referência dos serviços interligados de urgência do município ou região; lista de todos os telefones; mapas para capacidade instalada dos serviços de urgência e viária e mapas de risco)³. No organograma da Figura 1 está descrito a organização funcional e estrutural do SAMU-192 de Catanduva-SP.

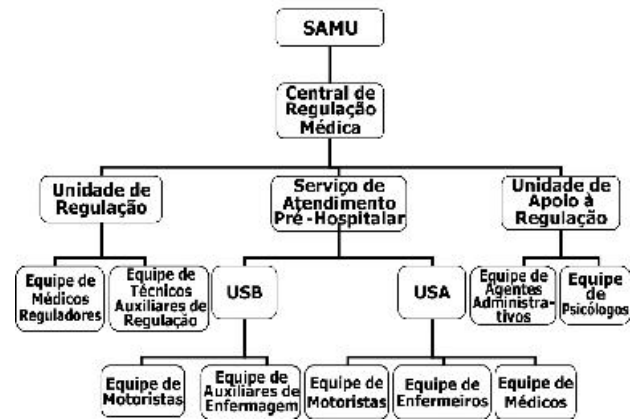


Figura 1 - Organograma da organização funcional e estrutural do SAMU-192 de Catanduva-SP

A importância desse sistema de atendimento pré-hospitalar se baseia no fato de que o tempo é essencial quando se refere a vítimas de trauma e está diretamente relacionado com o prognóstico, pois as primeiras horas pós-evento traumático é o período com maior índice de mortalidade⁵. A primeira hora (*"golden hour"*) é o principal momento para instituir o tratamento e é capaz de modificar o prognóstico do paciente⁶.

O Ministério da Saúde¹ considera o atendimento pré-hospitalar móvel, o "atendimento que procura chegar precocemente à vítima, após ter ocorrido um agravo a sua saúde (de natureza traumática ou não traumática, ou ainda, psiquiátrica), que possa levar ao sofrimento ou mesmo à morte, sendo necessário, portanto, prestar-lhe atendimento e/ou transporte adequado a um serviço de saúde devidamente hierarquizado e integrado ao Sistema Único de Saúde".

Apesar de ainda hoje existirem dúvidas a respeito do real impacto do atendimento pré-hospitalar para as vítimas, não se questiona a diminuição efetiva do tempo de chegada da vítima até o hospital mais adequado, além de proporcionar a realização de intervenções iniciais necessárias à manutenção da vida⁷.

Baseado no modelo francês, o Serviço de Atendimento Móvel de Urgência, SAMU-192, tem como regra que as viaturas de suporte avançado devem possuir, obrigatoriamente, um médico, diferentemente dos moldes americanos em que as atividades de resgate são exercidas por profissionais paramédicos⁸.

De maneira geral, o atendimento pré-hospitalar se divide em duas modalidades: o "Suporte Básico de

Vida”, realizado pelas equipes de suporte básico (USB), que tem como princípio não realizar manobras invasivas para preservação da vida, e o “Suporte Avançado à Vida”, realizado pelas equipes de suporte avançado (USA) que está autorizada a realizar certos procedimentos invasivos⁹.

A Equipe de Regulação Médica tem a função de coordenar e disponibilizar o atendimento pré-hospitalar à população local. A competência da Central de Regulação Médica é assumida, em seu todo, pelo médico regulador e, na ausência, pelo seu diretor médico e/ou coordenador. Cabe ao médico regulador: julgar e decidir sobre a gravidade de um caso, comunicado via rádio ou telefone, e disponibilizar os recursos a serem enviados, orientando o atendimento a ser realizado; administrar os meios disponíveis para a prestação do atendimento solicitado, evitando desgaste do sistema pelo envio de recursos insuficientes ou, até mesmo, superiores à necessidade em questão. Dessa maneira, tanto para as USA quanto para as USB, o médico regulador é o gerenciador do fluxo de circulação entre o campo pré-hospitalar e o hospitalar. Em suma, o médico regulador é responsável pela Regulação dos Atendimentos de Urgência da cidade, pelo Atendimento Móvel de Urgência da região e pelas transferências de pacientes graves da região (inter-hospitalares)¹⁰.

A USB é formada por uma tripulação exclusiva: um(a) técnico em enfermagem e um(a) condutor (motorista/socorrista). Todas as atividades desempenhadas pela equipe são feitas em conjunto, sem que haja diferenças hierárquicas entre os dois elementos da equipe. Esta equipe, com sua respectiva viatura, fica de prontidão nas Unidades Básicas Distritais de Saúde, aguardando determinação do médico regulador para prestar o atendimento determinado, o qual se restringe à prestação de assistência básica de vida, não importando a enfermidade ou o local do atendimento. São competências da equipe de suporte básico: atendimentos a pacientes traumatizados e portadores de doenças clínicas, quaisquer que sejam as causas, desde que seja estabelecido pelo médico regulador que não há risco imediato à vida¹⁰.

A USA constitui-se por um(a) médico(a), um(a) enfermeiro(a) e um(a) condutor(a). Esta equipe, com

sua respectiva viatura, aguarda nas Unidades Básicas Distritais de Saúde, a determinação do médico regulador para prestar o atendimento médico emergencial. A determinação de risco imediato a vida observado pelo médico regulador deve ser baseada, exclusivamente, no grau de comprometimento das funções vitais capazes de comprometer seriamente a qualidade de vida ou a expectativa de vida, como as abaixo relacionadas.

- comprometimento da via aérea (A),
- comprometimento da dinâmica respiratória (B),
- comprometimento da dinâmica circulatória (C),
- comprometimento da função neurológica (D),
- comprometimento funcional de extremidades (E).

Assim, são competências da equipe de suporte avançado: atendimentos a pacientes traumatizados e portadores de doenças clínicas, quaisquer que sejam as causas, desde que seja estabelecido pelo médico regulador que há risco imediato à vida¹⁰.

Nos traumas, para se normatizar o diagnóstico da gravidade, a avaliação correta para o transporte entre hospitais que condizem com o suporte necessário e a avaliação do *status* fisiológico em diferentes momentos do atendimento (da chegada na cena até a chegada do hospital), foi desenvolvido o *Revised Trauma Score (RTS)*¹¹, o qual tem boa aplicabilidade, por ser de simples execução, já que tem como variáveis a frequência respiratória, a pressão arterial sistólica e a escala de coma de Glasgow^{12,13}.

A equipe do SAMU-192 de Catanduva, cidade localizada na região noroeste do estado de São Paulo, com 109.362 habitantes (dados do IBGE em 2007)¹⁴, é formada por médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, motoristas socorristas, auxiliares de regulação médica, digitadores, auxiliares administrativos e auxiliar de serviços gerais. Iniciou suas atividades em julho de 2004 e está localizado na região central dessa cidade, cobrindo uma microrregião de 18 municípios através do número 192.

O objetivo desse estudo é conhecer o perfil dos atendimentos do SAMU-192 de Catanduva-SP, caracterizando os atendimentos realizados pela Unidade de Suporte Avançado (USA) e os dados epidemiológicos

dos indivíduos atendidos em uma cidade de médio porte (Catanduva-SP) e sua microrregião.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo, transversal, retrospectivo e epidemiológico. Foram utilizadas as informações contidas no banco de dados (Epiinfo 3.5.1®) da central de regulação médica do SAMU-192 de Catanduva-SP, referente aos atendimentos realizados de agosto de 2005 a novembro de 2008.

Foi registrada a saída de 89.407 equipes de atendimento, a qual foi regulada para 4.201 pacientes (4,7%) para a USA.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), respectivamente, sob os protocolos 0015.0.218.000-09 e 34/09.

RESULTADOS

Durante o período foi necessária a saída de 89.407 equipes de atendimento, da qual a USA foi regulada para 4.201 pacientes (4,7%). O município que mais solicitou o serviço foi Catanduva-SP com 94,7%. Dentre as cidades da microrregião, a cidade de Novo Horizonte-SP foi a que mais solicitou o serviço (1,3%).

Os horários de maior solicitação foram das 10h às 13h e das 19h às 21h, conforme se observa na Figura 2.

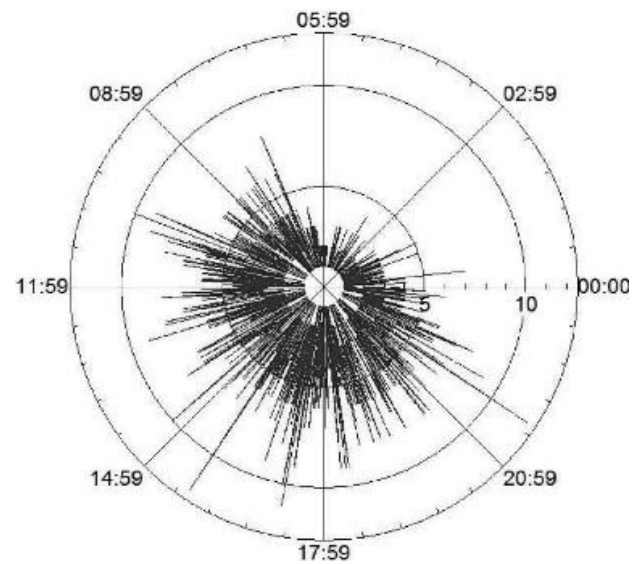


Figura 2 - Horário de atendimento das ocorrências da USA

A mediana de idade dos indivíduos foi de 45 e a moda de 40 anos. A Tabela 1 expressa a faixa etária segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e os tipos de ocorrência que os usuários requisitaram. Os agravos agudos por enfermidades clínicas apresentaram maior número de saídas da USA seguidos pelas causas externas (trauma).

Tabela 1 - Faixa etária e tipo de atendimento dos atendimentos pré-hospitalares realizados pela USA (primeira linha, números absolutos; segunda linha, números relativos)

	Não Informado	< 1	1-4	15-24	25-34	35-44	45-54	5-14	55-64	65-74	>75	Total
Ocorrência	33	0	1	3	7	5	6	1	1	5	11	73
não informada	2.9	0.0	12.1	0.7	1.6	1.4	1.6	0.7	0.3	1.5	1.9	1.7
Cirúrgico	9	1	0	1	3	5	1	0	0	0	1	21
	0.8	1.4	0.0	0.2	0.7	1.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5
Clínico	368	8	11	105	152	177	208	42	158	194	389	1812
	32.1	11.4	22.9	25.8	34.3	48.5	56.7	28.0	52.3	59.0	67.7	43.1
GO*	7	0	0	21	5	1	0	0	0	0	0	34
	0.6	0.0	0.0	5.2	1.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
Outros	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6
	0.4	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Pediátrico	28	42	22	4	1	0	1	37	0	0	0	135
	2.4	60.0	45.8	1.0	0.2	0.0	0.3	24.7	0.0	0.0	0.0	3.2
Psiquiatria	41	0	0	44	48	24	22	2	8	2	2	193
	3.6	0.0	0.0	10.8	10.8	6.6	6.0	1.3	2.6	0.6	0.3	4.6
Queimadura	4	0	0	2	3	2	2	0	0	0	0	13
	0.3	0.0	0.0	0.5	0.7	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
Retorno	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	6
	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.1
SVO*	19	1	0	0	2	4	8	1	13	18	74	140
	1.7	1.4	0.0	0.0	0.5	1.1	2.2	0.7	4.3	5.5	12.9	3.3
Transferência	52	9	4	17	16	23	29	9	41	39	46	285
	4.5	12.9	8.3	4.2	3.6	6.3	7.9	6.0	13.6	11.9	8.0	6.8
Transporte	61	6	0	10	10	24	39	8	42	42	34	276
	5.3	8.6	0.0	2.5	2.3	6.6	10.6	5.3	13.9	12.8	5.9	6.6
Trauma	516	3	10	199	195	99	51	50	39	28	17	1207
	45.1	4.3	20.8	48.9	44.0	27.1	13.9	33.3	12.9	8.5	3.0	28.7
Total	1145	70	48	407	443	365	367	150	302	329	575	4201

* Ginecologia e Obstetrícia - Tocoginecologia

** Serviço de Verificação de Óbito

Na Tabela 2 está expresso o destino dos pacientes atendidos pela USA: o maior fluxo de pacientes foi para a rede hierarquizada (atenção primária, secundária e terciária, segundo a regulação médica). É importante ressaltar que 9,6% das ocorrências foram óbitos. A utilização da rede hierarquizada está descrita na Tabela 3.

Tabela 2 - Destino dos pacientes atendidos pela USA

Destino	Frequência	Porcentagem
Rede hierarquizada	2991	74,8%
Liberado no local	126	3,2%
Óbito	384	9,6%
Endereço não encontrado	271	6,8%
Recusa de atendimento	148	3,7%
Transporte interhospitalar	80	2,0%
Total	4000	100,0%

Tabela 3 – Destino dos pacientes quando regulados para a rede hierárquica

Rede hierárquica regulada	Frequência	Porcentagem
Rede secundária	382	12,8%
Hospital secundário	151	5,1%
Hospital terciário	2074	69,4%
Hospital privado	357	11,9%
Outros	25	0,8%
Total	2989	100,0%

Na Tabela 4 estão expressos os principais procedimentos realizados pela USA no local do atendimento segundo o gênero. Vale ressaltar que foram desconsiderados os procedimentos nos quais não foi informado o gênero do paciente.

Tabela 4 - Principais procedimentos realizados na USA quanto ao gênero

Achado Clínico	gênero masculino	gênero feminino	p
Desobstrução de vias aéreas	55	22	0,095*
Utilização de Cânula de Guedel	19	8	0,460*
Utilização de oxigênio suplementar	536	343	0,667*
Necessidade de prancha rígida	469	189	0,000*/†
Necessidade de colar cervical	395	135	0,000*/†
Necessidade de KED ¹	10	7	0,991*
Necessidade de intubação endotraqueal	73	32	0,112*
Necessidade de ventilação mecânica	38	21	0,760*
Ressuscitação cardiopulmonar	41	21	0,547*
Acesso venoso central	5	3	0,632*
Necessidade de sutura local	11	0	0,004*/†
Desfibrilação	14	2	0,033*/†
Punção venosa periférica	567	302	0,001*/†
Curativos	163	29	0,00*/†
Imobilizações	183	53	0,00*/†

* Teste de Correlação de Yates, $\alpha = 5\%$

† Significância estatística

‡ Teste Exato de Fisher, $\alpha = 5\%$

†† Teste de Mantel-Haenszel, $\alpha = 5\%$

1. KED = Kendrick Extrication Device

Não foi possível o cálculo do RTS, pois os dados referentes às variáveis vitais não estavam disponíveis no banco de dados.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que 4,7% dos atendimentos necessitaram da unidade de suporte avançado, ou seja, intervenções médicas no local do agravo. A literatura

é escassa em quantidade e qualidade de informações a esse respeito. Segundo O'Dwyer e colaboradores¹⁵, as urgências absolutas variam de 10 a 30% dos casos, o que transpõe aos atendimentos da USA conclui-se que está abaixo do previsto, logo, pacientes considerados graves foram transportados por unidades de menor recurso. Outro fato relevante é a predominância do atendimento dentro do município de Catanduva-SP (94,7%), o que denota uma subutilização dos municípios pertencentes ao consórcio intermunicipal.

Quanto aos horários de atendimento expressos na Figura 1, a predominância ocorreu no período diurno, horário este em que a população está ativa.

A Tabela 1 revela que a maioria dos atendimentos deu-se por agravos clínicos (43,1%), sendo prevalente na faixa etária acima de 55 anos, ao contrário dos atendimentos por trauma, a segunda causa de utilização da USA, que foi mais prevalente abaixo dos 35 anos. Tais achados corroboram com os encontrados por Ladeira e Barreto em 2008⁶. A equipe de suporte avançado foi verificar ou atestar óbitos de causa natural de 140 pacientes, e a análise desse subgrupo demonstra maior frequência nos pacientes acima de 65 anos, o que é válido pelos dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) e DATASUS^{14,16}, que relacionam um maior número de óbitos por causa natural acima dessa faixa etária, o que justifica também a maior taxa de transporte e transferência (rede hierarquizada de maior complexidade) com equipes avançadas, devido a um maior número de doenças crônicas.

No subgrupo Psiquiatria chama à atenção a necessidade do atendimento na faixa etária dos 15 aos 34 anos, devido ao aumento do consumo de álcool e de drogas ilícitas¹⁷.

As Tabelas 2 e 3 declaram a forte tendência hospitalocêntrica¹⁸, uma vez que 74,8% dos indivíduos precisaram de acolhimento em alguma unidade de saúde; o hospital terciário foi responsável por 69,4% da demanda.

Em relação aos procedimentos que foram realizados pela equipe de suporte avançado (Tabela 4), destacam-se a necessidade de prancha rígida, colar cervical, suturas, punções venosas periféricas, curativos e imobilizações, nos quais se observou significância estatística entre os gêneros masculino e feminino. Na análise dos dados houve maior prevalência do gênero masculino, pois

há maior exposição aos agentes externos (trauma)¹³, já que esses procedimentos são utilizados, na maioria das vezes, nos usuários com agravos agudos dessa natureza.

Quanto ao procedimento desfibrilação, o gênero masculino também foi o mais prevalente, já que nesta parcela populacional a incidência de doenças cardiovasculares é maior, levando a uma maior utilização deste procedimento para tratamento agudo¹⁹.

CONCLUSÃO

O atendimento médico pré-hospitalar, criado em virtude da necessidade de se reduzirem as sequelas e óbitos nesse campo, vem evoluindo lentamente no Brasil, estando em fase de implantação e expansão. Especificamente, quanto aos profissionais de saúde, cabe ressaltar que a sua atuação é imprescindível em todo o processo de assistência à população, desde a prevenção destes eventos, através da orientação e educação continuada à saúde, além de treinamento aos profissionais engajados no sistema de atendimento pré-hospitalar até sua assistência às vítimas em ambiente hospitalar.

Ainda que na fase pré-hospitalar não se reverta um quadro extremamente grave, a rapidez de chegada à cena e ao hospital, bem como as intervenções iniciais apropriadas, previnem o agravamento do quadro e o surgimento de novas lesões, melhoram condições para alguns casos e até atrasam resultados fatais, dando à vítima a oportunidade de chegar ao tratamento definitivo e beneficiar-se.

Com relação ao atendimento na microrregião de Catanduva, deve-se ressaltar que a equipe de atendimento avançada é acionada em número inferior a necessidade; esse déficit se deve à falta de treinamento dos médicos reguladores e das equipes de atendimento do pré-hospitalar fixo da microrregião.

Novos estudos sobre o assunto são necessários para avaliar a cobertura, acesso e qualidade dos serviços de atenção pré-hospitalar no Brasil, levando-se também em consideração a grande expansão destes serviços no país, assim como a mudança do perfil de atendimento ocorrida a partir da implantação do SAMU.

Agradecimentos

Aos servidores do SAMU-192 de Catanduva do período do estudo, pela dedicação e cuidados aos pacientes e à instituição.

Revisão linguística

O presente artigo foi revisado pela Sra. Mariani Roberto nos aspectos linguísticos em português e inglês.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº. 814 de 1 de junho de 2001. Institui as diretrizes de regulação das urgências e normatiza os serviços de atendimento pré-hospitalar móvel. Diário Oficial da União 2001; 4 jun.
2. Portaria nº. 1864 de 29 de setembro de 2003. Institui o componente pré-hospitalar móvel da Política Nacional de Atenção às Urgências. Diário Oficial da União 2003; 5 out.
3. Ministério da Saúde. Decreto nº. 5.055. Institui o Serviço de Atendimento Móvel de Urgência – SAMU, em municípios e regiões do território nacional, e dá outras providências. [Diário Oficial da União 2004; 27 abr].
4. Minayo MCS, Deslandes SF. Análise da implantação do sistema de atendimento pré-hospitalar móvel em cinco capitais brasileiras. Cad Saúde Pública. 2008; 24(8):1877-86.
5. Whitaker IY, Gutiérrez MGR, Koizumi MS. Gravidade do trauma avaliada na fase pré-hospitalar. Rev Assoc Med Bras. 1998; 44:111-9.
6. Ladeira RM, Barreto SM. Fatores associados ao uso de serviço de atenção pré-hospitalar por vítimas de acidentes de trânsito. Cad Saúde Pública. 2008; 24(2):287-94.
7. Malvestio MAA, Sousa RMC. Atendimento a acidentados de trânsito. Rev Saúde Pública. 2002; 36(5):584-9.
8. Serviço de Atendimento Móvel Avançado - SAMU. [acesso em 2010 out 10]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=456
9. Malvestio MAA, Sousa RMC. Sobrevivência após acidentes de trânsito: impacto das variáveis clínicas e pré-hospitalares. Rev Saúde Pública. 2008; 42(4):639-47.
10. Lopes SLB, Fernandes RJ. A brief review of medical prehospital care. Medicina. 1999; 32:381-7.
11. Fraga GP, Mantovani M, Magna LA. Índices de trauma em pacientes submetidos à laparotomia. Rev Col Bras Cir. 2004; 31(5):299-306.
12. Colégio Americano de Cirurgiões. Manual de suporte avançado a vida no trauma – ATLS: programa para médicos: 1996.
13. Tambellini AT, Osanai CH. Epidemiologia do trauma. In: Freire E. Trauma: a doença dos séculos. São Paulo: Atheneu; 2001.
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [acesso em 2009 ago 15]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>
15. O'Dwyer GO, Oliveira SP, Seta MH. Avaliação dos serviços hospitalares de emergência do programa QualiSUS. Ciênc Saúde Coletiva. 2009; 14(5):1881-90.
16. Datasus. Ministério da Saúde. [acesso em 2010 out 10]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtbl.def>
17. Arnauts I. Percepção do risco e perfil socioeconômico de jovens vítimas de trauma e usuários de álcool [dissertação em enfermagem]. Cascavel: Universidade Estadual de Maringá; 2009.
18. Lima IMN. A assistência ambulatorial como alternativa à assistência hospitalocêntrica em saúde mental: um estudo de caso realizado no Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo [dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto USP; 2000.
19. Mattos LA, Lemos Neto PA, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Sousa AGMR, Devito FS et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Intervenção coronária percutânea e métodos adjuntos diagnósticos em cardiologia intervencionista (II Edição – 2008). Arq Bras Cardiol. 2008; 91(6 supl.1):1-58.

PERFIL DOS RECÉM-NASCIDOS ICTÉRICOS INTERNADOS NUM HOSPITAL-ESCOLA DE CATANDUVA-SP

ICTERIC NEWBORNS'S PROFILE HOSPITALIZED IN A TEACHING HOSPITAL, IN CATANDUVA CITY, SP, BRAZIL

Aline Regina Zöll*, Ariane Cristina Zöll*, Thiago Augusto Neiva Spironelli*, Terezinha Soares Biscegli**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever o perfil clínico, laboratorial e o tipo de tratamento utilizado nos recém-nascidos ictericos internados no Hospital-Escola Padre Albino, localizado em Catanduva-SP. Estudo quantitativo, transversal, retrospectivo, com revisão de 282 prontuários de recém-nascidos, no período de abril/2006 a abril/2011. Foram registrados dados clínicos, laboratoriais e o tipo de tratamento. Das internações, 49,6% eram do gênero masculino, 50,4% do gênero feminino, 19,3% eram prematuros e 80,7% a termo. A idade gestacional foi $38,2 \pm 1,8$ semanas. A idade do recém-nascido ao diagnóstico foi $3,1 \pm 4,3$ dias. Icterícia precoce foi diagnosticada em 49,3% dos casos e tardia em 50,7%. Valores de pico e de alta hospitalar de bilirrubina foram $13,7 \pm 4,6$ e $8,9 \pm 2,6$ mg/dL, respectivamente. Reticulócitos de pico e de alta foram $2,7 \pm 1,7$ e $2,4 \pm 1,3\%$, respectivamente. Coombs, direto e indireto, foram negativos em 99,4% e 80%, respectivamente. Incompatibilidade sanguínea foi detectada em 53,8%. Fototerapia foi usada em 96,5%. Nenhuma exsanguíneotransfusão foi registrada. O período de internação hospitalar foi de $3,2 \pm 2,0$ dias. A idade do recém-nascido na alta foi $6,3 \pm 4,2$ dias. Concluiu-se que o perfil clínico e laboratorial dos recém-nascidos ictericos internados no Hospital Padre Albino não difere de maneira significativa dos perfis de outros hospitais e que a fototerapia foi o principal tratamento. Nenhum relato de exsanguíneotransfusão e complicações sugerem detecção precoce da icterícia e tratamento adequado. O pico de bilirrubina no quarto dia de vida deve servir de alerta para a alta precoce dos recém-nascidos.

Palavras-chave: Icterícia neonatal. Recém-nascido. *Kernicterus*. Fototerapia.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the clinical and laboratory profile, and the treatment used in icteric newborns admitted in a Padre Albino Teaching Hospital, in Catanduva City-SP, Brazil. This retrospective study comprised 282 newborns hospitalized from April/2006 to April/2011. Data about clinical, laboratory and treatment were obtained from medical records. Of the hospitalizations, 49.6% were male, 50.4% female, 19.3% were born premature and 80.7% full-term. Gestational age was 38.2 ± 1.8 weeks. The age of newborns at diagnosis was 3.1 ± 4.3 days. Early jaundice was diagnosed in 49.3% and late jaundice in 50.7%. Bilirubin's levels of peak and hospital discharge were 13.7 ± 4.6 and 8.9 ± 2.6 mg/dL, respectively. Reticulocyte's levels of peak and hospital discharge were 2.7 ± 1.7 and $2.4 \pm 1.3\%$, respectively. Coombs, direct and indirect, were negative in 99.4% and 80%, respectively. Blood incompatibility was detected in 53.8%. Phototherapy was used in 96.5%. Exchange transfusion was not registered. The length hospital stay was 3.2 ± 2.0 days. The newborn's age at the hospital discharge was 6.3 ± 4.2 days. It was concluded that clinical and laboratory profile of icteric newborns admitted at Padre Albino Hospital it's not different from profiles of other hospitals and that phototherapy was the main treatment. The absence of cases of transfusion and complications suggests that the jaundice was detected early and the treatment was effective. The bilirubin's peak in the fourth day of life may serve as a warning to early hospital discharge of the newborn.

Keywords: Jaundice neonatal. Infant, Newborn. *Kernicterus*. Phototherapy.

* Acadêmicos do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

** Pediatra, Doutora em Medicina pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora e Coordenadora do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: terezinhabiscegli@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

A icterícia é uma frequente condição clínica do recém-nascido (RN), podendo constituir um importante problema do período neonatal^{1,2}. Aproximadamente 60% dos neonatos a termo e 80% dos prematuros apresentam icterícia durante a primeira semana de vida³. Ela é caracterizada pela coloração amarelada da pele e escleróticas, em consequência de elevação da bilirrubina acima de 5-7 mg/dL⁴. A etiologia caracteriza-se por ser multifatorial e o tratamento dependerá do tipo e da intensidade da icterícia¹.

Em 2004, Carvalho⁵ relacionou de forma didática alguns fatores importantes na determinação da adequada terapêutica, dando ênfase à história materna obstétrica e de parto, história neonatal, tempo de aparecimento da icterícia e sua evolução, exame físico do RN e exames laboratoriais tais como Grupo sanguíneo, Fator Rh, Coombs direto, Concentração sérica de bilirrubina total e frações, Hematócrito e Hemoglobina. A avaliação destes parâmetros permite diagnosticar se a hiperbilirrubinemia é fisiológica ou patológica.

A icterícia tem características patológicas se for detectável clinicamente nas primeiras 24 horas de vida; se a concentração de bilirrubina aumentar mais que 5 mg/dL dia; se a fração direta for maior que 2 mg/dL; se o nível sérico de bilirrubina total exceder 15 mg/dL e se a icterícia persistir por mais de uma semana no RN a termo e por duas semanas no prematuro⁵.

A icterícia fisiológica é a principal causa de icterícia neonatal, correspondendo ao aumento da bilirrubina indireta (não-conjugada). Trata-se de uma condição reversível e, em geral, benigna, que se inicia após as primeiras 24 horas de vida. Já as situações patológicas de icterícia se apresentam nas primeiras 24 horas de vida, o que indica uma desordem subjacente de potencial gravidade. A icterícia patológica pode se originar de condições como incompatibilidade sanguínea Rh ou ABO; anormalidades hepáticas, biliares ou metabólicas ou ainda de infecções⁶⁻⁸.

Uma vez determinados tipo e intensidade da hiperbilirrubinemia, devem-se decidir quando e qual terapia será introduzida. O objetivo principal do diagnóstico e tratamento da hiperbilirrubinemia é prevenir

suas complicações neurológicas, pois níveis séricos de bilirrubina indireta de, aproximadamente, 20 mg/dL ou mais, podem levar a impregnação cerebral pelo pigmento amarelo, dando origem a uma encefalopatia denominada *Kernicterus*, que é a complicação mais grave e mais temida nos recém-nascidos, aumentando a mortalidade neonatal e levando a sequelas neurológicas importantes^{9,10}.

O tratamento da hiperbilirrubinemia pode ser feito por fototerapia, exsanguíneotransfusão ou por fármacos^{4,5}. Uma vez que a exposição à luz não traz complicações imediatas ao recém-nascido¹¹, a fototerapia apresenta-se como a modalidade terapêutica mais utilizada mundialmente para o tratamento da hiperbilirrubinemia indireta^{12,13}, enquanto a exsanguíneotransfusão, devido à alta incidência de eventos adversos a ela relacionados¹⁴, fica reservada apenas para os casos mais graves.

Com base no exposto anteriormente, o objetivo do presente estudo é descrever o perfil clínico, laboratorial e o tipo de tratamento utilizado nos recém-nascidos icterícios internados nos setores de Pediatria do Hospital Escola Padre Albino e comparar os resultados com dados de outros hospitais.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo do tipo quantitativo, transversal, retrospectivo, no qual foram revisados 282 prontuários e compilados dados relacionados às crianças de zero a 28 dias de vida (recém-nascidos ou neonatos), que foram internadas nos setores de Pediatria do Hospital Escola Padre Albino, do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), de Catanduva-SP, no período de abril de 2006 a abril de 2011, com diagnóstico de Icterícia neonatal (registro clínico de coloração amarelada da pele e escleróticas e/ou elevação da bilirrubina acima de 5-7 mg/dL¹. Foram excluídos os prontuários que não apresentavam registro sobre os valores de bilirrubina de pico (o maior valor detectado) e de alta e o tipo de tratamento utilizado.

Os prontuários foram revisados individualmente e para cada criança foram registrados dados clínicos e laboratoriais. Dentre os dados clínicos foram apurados: gênero, duração da gestação, antecedentes maternos

de doenças infecciosas na gestação, idade do RN no momento do diagnóstico da icterícia e idade da alta hospitalar, classificação da icterícia em precoce ou tardia⁵, quantificação clínica da icterícia (zona de Kramer¹⁵), tipo de tratamento, tempo de hospitalização e comorbidades associadas. Dos dados laboratoriais foram anotados: bilirrubinas de pico e na ocasião da alta hospitalar, reticulócitos em seus valores máximos e na alta hospitalar, tipagem sanguínea da mãe e do recém-nascido e Coombs direto e indireto.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição que considerou desnecessária a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por se tratar de estudo de levantamento de prontuários.

Os resultados foram expressos em número, porcentagem, média e desvio-padrão (média \pm DP), valores máximo e mínimo.

RESULTADOS

Dos 282 prontuários analisados, 142 (50,4%) pertenciam ao gênero feminino e 140 (49,6%) ao gênero masculino.

A idade gestacional estava registrada em 176 prontuários. Destes, 34 (19,3%) eram de RN prematuros e 142 (80,7%) de RN a termo, sendo que a idade gestacional média foi de $38,2 \pm 1,8$ semanas (máxima 41,4 e mínima 32 semanas).

Na Tabela 1 estão descritos os dados referentes à idade média do RN quando foi constatada clinicamente a icterícia; à idade média do RN no momento do pico de bilirrubina e o tempo para atingir o pico de bilirrubina.

Quanto à classificação, a icterícia precoce foi diagnosticada em 139 (49,3%) RN e a tardia em 143 (50,7%). A icterícia precoce incidiu em 64,7% dos prematuros e em 73,9% dos a termo e a icterícia tardia em 35,3% dos prematuros e 26,1% dos a termo.

Média e DP dos valores de pico de bilirrubinas (total, indireta e direta) e bilirrubinas da alta hospitalar, bem como seus valores máximos e mínimos estão apresentados no Gráfico 1. Em 27 recém-nascidos (9,6%), os valores de pico da bilirrubina total estavam acima de 20 mg/dL e em 100% dos casos, o aumento de bilirrubina total era à custa de bilirrubina indireta.

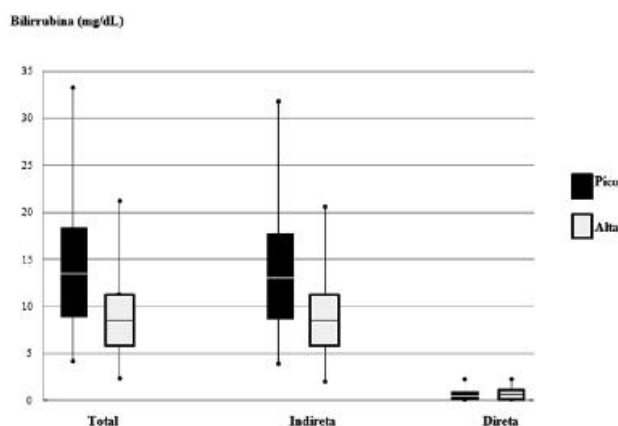


Gráfico 1 - Valores de bilirrubinas nos recém-nascidos internados no Hospital-Escola Padre Albino, em Catanduva, SP, no período de abril/2006 a abril/2011

Valores de reticulócitos estavam registrados em 180 prontuários, sendo $2,7 \pm 1,7\%$ o valor de pico (mínimo 0 e máximo 12,9%) e $2,4 \pm 1,3\%$ o de alta hospitalar (mínimo 0 e máximo 10,4%).

Valores de Coombs direto foram registrados em 175 prontuários, sendo que em 174 (99,4%) deles o resultado foi negativo. Coombs indireto só estava registrado em 5 prontuários e, destes, 4 (80%) apresentaram resultado negativo. Nenhum recém-nascido com icterícia precoce apresentou positividade para os testes de Coombs.

As zonas de Kramer foram documentadas em 259 prontuários. Destes, 2 (0,8%) recém-nascidos apresentaram zona I; 17 (6,6%) zona II; 68 (26,2%) zona III; 141 (54,4%) zona IV e 31 (12,0%) zona V.

A correlação entre pico de bilirrubina total e zona de Kramer está demonstrada no Gráfico 2.

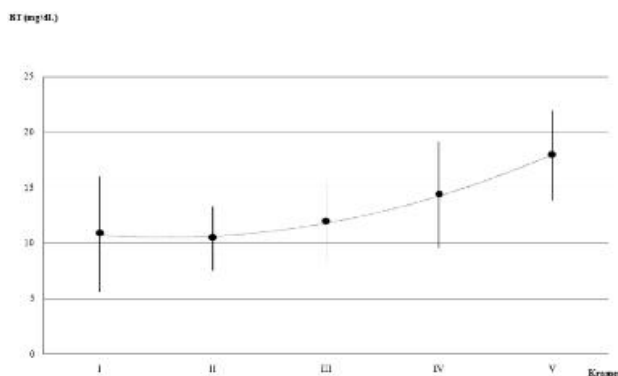


Gráfico 2 - Bilirrubina total (BT) versus zonas de Kramer nos recém-nascidos no Hospital-Escola Padre Albino, em Catanduva, SP, no período de abril/2006 a abril/2011

Os dados referentes ao diagnóstico de incompatibilidade sanguínea materno-fetal, baseados nos resultados da tipagem sanguínea da mãe e do RN, foram verificados em 208 prontuários e estão evidenciados na Tabela 2. Dos 112 (53,8%) recém-nascidos que apresentaram incompatibilidade dos sistemas Rh ou ABO, 13 (11,6%) apresentaram incompatibilidade mista (Rh e ABO). Dos 139 recém-nascidos que apresentaram icterícia precoce, 77 (55,4%) deles tiveram confirmado o diagnóstico de incompatibilidade sanguínea materno-fetal.

Comorbidades perinatais foram diagnosticadas em 46 (16,3%) dos recém nascidos. Destas, 11 (23,9%) estavam descritas como sofrimento fetal agudo, 11 (23,9%) como alterações metabólicas, 10 (21,7%) como doenças infecciosas, 7 (15,2%) como cardiopatias, 5 (10,9%) como doenças respiratórias e 2 (4,4%) como doenças hepáticas.

Antecedentes de doenças infecciosas no período gestacional estavam registrados em 83 (29,4%) prontuários. Destas, a mais frequente foi a infecção do trato urinário (70 casos, 84,3%), seguida de toxoplasmose (9 casos, 10,9%) e rubéola, hepatite, AIDS e citomegalovírus (1 caso de cada, 1,2% cada). Dos 143 recém-nascidos que apresentaram icterícia tardia, 19 (13,3%) deles apresentavam documentados antecedentes maternos de infecção de trato urinário no período gestacional.

A análise do tipo de tratamento utilizado para a icterícia demonstrou que dos 282 recém-nascidos, 272 (96,5%) foram tratados com fototerapia e os 10 restantes (3,5%) com conduta expectante. Estes últimos apresentavam bilirrubina total média de 12,6 mg/dL. Nenhum recém-nascido foi submetido à exsanguíneotransusão.

O período médio de internação hospitalar foi de 3,2 ± 2,0 dias (com variação de 1 a 16 dias).

A idade média do RN na alta hospitalar foi 6,3 ± 4,2 dias (máximo 26 e mínimo 2 dias).

Tabela 1 – Idade do RN ao ser diagnosticada a icterícia e no momento do pico de bilirrubina e tempo decorrido desde o diagnóstico até o pico de bilirrubina. Hospital Padre Albino, Catanduva-SP – abril/2006 a abril/2011

	Média ± DP*	Valor máximo*	Valor mínimo*
Idade ao diagnóstico	3,1 ± 4,3	24	0
Idade no pico de bilirrubina	4,5 ± 4,0	25	0
Tempo para atingir o pico de bilirrubina	1,4 ± 1,7	14	0

* em dias

Tabela 2 – Prevalência de incompatibilidade sanguínea materno-fetal nos recém-nascidos internados no Hospital-Escola Padre Albino, em Catanduva-SP, no período de abril/2006 a abril/2011

Tipo	N	%
ABO	83	39,9
Rh	29	14,0
Ausente	96	46,1

DISCUSSÃO

Apesar das dificuldades operacionais encontradas em se obter informações de prontuários médicos, o presente estudo contou com uma amostra final representativa do universo pesquisado. Vale salientar que nem todos os parâmetros investigados estavam documentados nos 282 prontuários analisados, mas mesmo assim os dados obtidos eram confiáveis e conseguiram retratar o perfil dos recém-nascidos icterícios internados no Hospital Escola Padre Albino.

A análise dos prontuários revelou prevalência semelhante entre os gêneros (50,4% pertencentes ao gênero feminino e 49,6% ao masculino). Moro e colaboradores¹⁶, em um estudo com recém-nascidos de um hospital de Tubarão-SC, em 2004, observaram discreta predominância do gênero feminino (56,7%). Já o estudo de Silva e colaboradores¹⁷, realizado em um hospital do Chile, mostrou predominância do gênero masculino, variando de 54 a 65%, de acordo com o grupo estudado.

Em relação à idade gestacional de nossa amostragem (38,2 semanas), os resultados foram semelhantes aos de Silva e colaboradores¹⁷ (38,4 semanas). Perazzini e colaboradores¹⁸, em um estudo de acompanhamento de recém-nascidos de termo e próximos ao termo icterícios, na cidade de Campinas-SP, e Aycicek e colaboradores¹⁹, estudando recém-nascidos icterícios em um hospital da Turquia, encontraram valores discretamente maiores (38,8 e 39,0 semanas, respectivamente).

Em nosso estudo a icterícia prevaleceu nos recém-nascidos a termo (80,7%). Resultados diferentes foram verificados por Moro e colaboradores¹⁶ que registraram distribuição equilibrada entre nascidos a termo e pré-termo (43,3% e 56,7%, respectivamente). Vale lembrar que em apenas 62% de nossos prontuários havia registro da idade gestacional.

No presente estudo a idade média do RN, quando constatada clinicamente a icterícia, foi 3,1 ± 4,3

dias e a idade média do RN no momento do pico de bilirrubina foi $4,5 \pm 4,0$ dias. No estudo de Silva e colaboradores¹⁷ foram de $2,7 \pm 1,0$ em um grupo e $3,4 \pm 1,9$ dias no outro.

Baseado na cronologia de aparecimento da icterícia, alguns autores costumam classificá-la em precoce ou tardia⁵. É denominada icterícia precoce quando detectável nas primeiras 24 horas de vida do recém-nascido e tardia, após este período de tempo. A icterícia precoce está mais relacionada com situações patológicas, enquanto a icterícia tardia ocorre principalmente devido a condições fisiológicas do recém-nascido e geralmente sem comorbidades associadas⁷. Em nossa pesquisa os percentuais de icterícia precoce e tardia foram semelhantes (49,3 e 50,7%, respectivamente). Já Cianciarullo e colaboradores²⁰, estudando a doença hemolítica em uma maternidade de São Paulo, detectaram incidência de icterícia precoce em 14,1% e tardia em 69,3%. Vale ressaltar que este último trabalho era altamente específico e de maior complexidade.

De acordo com a literatura¹, a causa mais frequente de icterícia precoce, devido à hiperbilirrubinemia indireta, é a incompatibilidade sanguínea materno-fetal, sendo que a doença hemolítica neonatal por incompatibilidade ao sistema ABO vem assumindo papel importante por causa de sua incidência elevada e a diminuição da incidência da incompatibilidade Rh²⁰. Em nosso estudo a incompatibilidade sanguínea foi detectada em 53,8% dos recém-nascidos (Tabela 2) e a análise do sistema determinante da incompatibilidade revelou prevalência do sistema ABO quando comparado ao Rh (39,9 e 14%, respectivamente), fato este também observado em outros estudos²¹⁻²³.

Apesar dos avanços tecnológicos, a hemólise no recém-nascido é de difícil documentação porque a hiperbilirrubinemia indireta é comum e os níveis de hemoglobina são estáveis durante a primeira semana de vida. Neste contexto, o parâmetro mais confiável é o número de reticulócitos que, embora alto no recém-nascido (4,1% a 6,3%), normaliza-se ao terceiro dia de vida. Dessa forma, a persistência de reticulocitose é compatível com processo hemolítico, embora a reticulopenia não o exclua²⁰. Em nossa revisão, os valores

de reticulócitos estavam registrados em 63,8% dos prontuários, sendo $2,7 \pm 1,7\%$ o valor de pico, correspondente a $4,5 \pm 4,0$ dias de vida, o que reforçou a hipótese de hemólise.

Segundo Cianciarullo e colaboradores²⁰, para realizar um diagnóstico preciso de doença hemolítica no RN é necessária a realização de testes que detectem anticorpos antieritrocitários como o teste de Coombs indireto, direto e o teste de eluição. Nossa análise dos valores de Coombs direto, registrados em 62,1% dos prontuários, evidenciou resultado negativo em 99,4% deles. Quanto ao Coombs indireto só havia registro em 1,8% dos prontuários e destes, 80% apresentaram resultado negativo. Nenhum recém-nascido com icterícia precoce apresentou positividade para os testes de Coombs. O estudo de Cianciarullo e colaboradores²⁰ detectou incidência de doença hemolítica em 36,2% dos casos e identificou teste de Coombs direto positivo com variação de 46,7 a 100%, na dependência de cada grupo estudado.

Em nosso estudo não foi possível resgatar, em todos os casos, antecedentes de infecções no período gestacional que contribuíssem para minimizar ou agravar a síndrome icterícia. Das infecções maternas registradas, a mais frequente foi a do trato urinário, o que está de acordo com a literatura específica⁷. Com relação ao RN, das comorbidades perinatais detectadas (16,3%), as mais frequentes foram o sofrimento fetal agudo e as alterações metabólicas, o que também é compatível com dados de literatura⁷.

Na atual pesquisa, os valores de pico de bilirrubinas total, indireta e direta (Gráfico 1) foram $13,7 \pm 4,6$; $13,2 \pm 4,5$ e $0,5 \pm 0,3$ mg/dL, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Moro e colaboradores¹⁶ ($12,9 \pm 5,5$ mg/dL de bilirrubina total, $11,9 \pm 4,7$ de indireta e $0,9 \pm 1,3$ de direta). Já Silva e colaboradores¹⁷ encontraram valores discretamente superiores ($16,7 \pm 1,7$ e $16,5 \pm 1,9$ mg/dL, nos dois grupos estudados).

Com relação ao exame físico da icterícia neonatal, Kramer¹⁵ elaborou uma tabela que relaciona a zona dérmica de icterícia com os níveis médios da bilirrubina indireta, considerando sua evolução craniocaudal: zona

1 (cabeça e pescoço, cerca de 6 mg/dL); zona 2 (zona 1 + tórax, cerca de 9 mg/dL); zona 3 (zona 2 + abdomen e coxas, cerca de 12 mg/dL); zona 4 (zona 3 + braços e pernas, cerca de 15 mg/dL) e zona 5 (zona 4 + mãos e pés, cerca de 16 mg/dL ou +). Esta classificação ocorre em caráter subjetivo, uma vez que é examinador dependente. Ela é mais fidedigna em recém-nascidos pertencentes à etnia branca, por existir dificuldade em discernir coloração amarelada em recém-nascidos de outras etnias⁶. Além do método citado não ser considerado confiável por autores consagrados da literatura pediátrica³, estudos recentes mostram que a avaliação da progressão céfalo-caudal, isoladamente, tem pobre correlação com os valores reais de bilirrubina sérica (Coeficiente de Pearson: 0,48)²⁴. No presente estudo, a análise concomitante dos níveis séricos de bilirrubinas e da quantificação clínica da icterícia pelas zonas de Kramer (Gráfico 2) evidenciou que níveis de bilirrubina iguais ou inferiores a 10 mg/dL não permitiram uma diferenciação entre as zonas 1 e 2, enquanto níveis de bilirrubina acima de 13 mg/dL demonstraram correlação positiva com a progressão da zona de Kramer. Já o estudo de Moro e colaboradores¹⁶ que objetivou correlacionar os níveis séricos de bilirrubinas com a avaliação clínica pelo método estratificado em cruces não conseguiu demonstrar correlação expressiva entre os dois parâmetros.

No concernente ao tratamento da icterícia, de acordo com De Carvalho²⁵, a forma mais usada é a fototerapia e sua indicação dependerá do tipo de icterícia (hemolítica ou não hemolítica) e de características próprias do recém-nascido (termo ou pré-termo, presença de asfixia, equimoses etc). Segundo o autor, a determinação da concentração sérica de bilirrubina é altamente imprecisa quando se utilizam métodos convencionais e, portanto, esse nível não pode ser considerado isoladamente. Deve ser analisado dentro de um contexto global que inclua diversos fatores relacionados ao recém-nascido e sua história perinatal. Em recém-nascidos a termo, saudáveis e com icterícia não hemolítica (fisiológica), a tendência atual tem sido protelar o uso da fototerapia até que a bilirrubina sérica atinja valores consideravelmente superiores aos utilizados no passado. A razão dessa conduta é o aval de inúmeras publicações

científicas que demonstram a ausência de correlação entre o nível sérico de bilirrubina e dano neurológico em recém-nascidos a termo com icterícia não hemolítica. Segundo a Academia Americana de Pediatria²⁶, a fototerapia deveria ser iniciada em recém-nascidos a termo com icterícia não-hemolítica com níveis séricos de bilirrubina de 15mg/dL. Em pacientes com mais de 48 horas de vida, estes níveis se situariam entre 18 e 20mg/dL. Entretanto, apesar das recomendações preconizadas por esta instituição, a maioria dos pediatras e neonatologistas ainda continuam, nestes pacientes, indicando fototerapia com níveis séricos de bilirrubina mais baixos²⁵.

Outra forma de tratamento da icterícia é a exsanguíneotransusão²⁵. Suas indicações devem ser individualizadas e sempre baseadas em julgamento clínico global do paciente icterício. De um modo geral, existem dois tipos de indicações de exsanguíneotransusão: uma precoce e outra dita tardia. Os critérios para indicação de exsanguíneotransusão precoce incluem hemoglobina no cordão menor do que 12 mg/dL, bilirrubina no sangue do cordão acima de 4 mg/dL e uma velocidade de ascensão nos níveis séricos de bilirrubina superior a 0,5 mg/dL por hora. Os valores de bilirrubina para indicação de exsanguíneotransusão tardia são bastante controversos e variam de 20 a 25 mg/dL.

Em nosso estudo, não foi possível avaliar os critérios que foram utilizados para se determinar o tipo de tratamento, pois estavam registrados apenas os valores de bilirrubina sanguínea (máximo 33,52 e mínimo 4,19 mg/dL) e, na maioria dos casos (96,5%), documentada a realização da fototerapia. Vale ressaltar que a única forma de tratamento instituído foi a fototerapia, apesar dos valores bastante elevados de bilirrubina encontrados em alguns casos (9,6% dos recém-nascidos com bilirrubina de pico acima de 20 mg/dL). Vale também lembrar que apesar dos níveis elevados de bilirrubina, nenhum RN foi submetido à exsanguíneotransusão e nenhum caso de *kernicterus* foi registrado. Perazzini e colaboradores¹⁸ também não registraram a necessidade de exsanguíneotransusão. De acordo com De Carvalho²⁵, a fototerapia é o principal recurso para tratamento da icterícia neonatal, pois a

exossanguíneotransfusão implica em maior taxa de complicações (trombocitopenia, hipocalcemia, apneia e infecção)^{14,27,28}.

Os recém-nascidos deste estudo receberam alta hospitalar com bilirrubina total média de $8,9 \pm 2,6$ mg/dL e reticulócitos de $2,4 \pm 1,3\%$. Este valor de bilirrubina mostrou-se discretamente inferior aos observados por Perazzini e colaboradores¹⁸ ($11,1 \pm 2,6$ mg/dL para casos retornados, $11,0 \pm 2,8$ para casos não retornados e $13,1 \pm 2,6$ para casos reinternados) e aos de Silva e colaboradores¹⁷ ($13,5$ e $12,9$ mg/dL, em ambos os grupos estudados).

A idade média de alta hospitalar neste estudo foi de $6,3 \pm 4,2$ dias e o período médio de internação hospitalar foi de $3,2 \pm 2,0$ dias. Perazzini e colaboradores¹⁸ registraram idades de alta consideravelmente menores que as documentadas no presente estudo ($2,9 \pm 1,4$ dias para casos retornados, $2,9 \pm 0,1$ não retornados e $3,2 \pm 1,9$ para reinternados), o que pode justificar o alto

índice de reinternação deles comparado ao nosso estudo (13,2% e zero, respectivamente).

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que o perfil clínico e laboratorial dos recém-nascidos ictericos internados no Hospital Escola Padre Albino, respeitadas as particularidades de cada estudo, não difere de maneira significativa dos perfis de outros hospitais e que, a exemplo de outros serviços, a fototerapia foi de fundamental importância no manejo da icterícia, correspondendo ao principal tratamento. A não constatação de casos de exossanguíneotransfusão e complicações (*kernicterus*) sugerem detecção precoce da icterícia e tratamento adequado. Atenção especial deve ser dada ao pico de bilirrubina observado entre o quarto e quinto dias de vida, que pode servir de alerta contra a alta precoce dos recém-nascidos (24 horas), atualmente muito comum nos berçários.

REFERÊNCIAS

1. Maisels MJ. Icterícia. In: Macdonald MG, Seshia MMK, Mullett MD, editores. Fisiopatologia e tratamento do recém-nascido. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 703-77.
2. Vieira AA, Lima CLM, Carvalho M, Moreira MEL. O uso da fototerapia em recém-nascidos: avaliação da prática clínica. Rev Bras Saúde Mater Infant. 2004; 4(4):1-17.
3. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editores. Tratado de pediatria. 16ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
4. Coelho AF. Icterícia no recém-nascido. In: Simões A. Manual de neonatologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 109-22.
5. Carvalho M. Tratamento da icterícia neonatal: estado da arte. In: Moreira MEL, Lopes JMA, Carvalho M, editores. O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2004. p. 317-45.
6. Ramos JLA. Icterícia do recém-nascido: aspectos atuais. Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba. 2002; 4:17-30.
7. Araújo MCK, Ramos JLA, Vaz FAC. Icterícia neonatal. Rev Pediatr Mod, Especial Neonatologia. 2000; 36:84-90.
8. Schwoebel A, Gennaro S. Neonatal hyperbilirubinemia. J Perinat Neonat Nurs. 2006; 20(1):103-7.
9. Bhutani VK, Johnson LH, Maisels MJ, Newman TB, Phibbs C, Stark AR et al. Kernicterus: epidemiological strategies for its prevention through systems-based approaches. J Perinatol. 2004; 24:650-62.
10. Vinhal RM, Cardoso TRC, Formiga CKMR. Icterícia neonatal e kernicterus: conhecer para prevenir. Rev Movimenta. 2009; 2:93-101.
11. Oliveira JV. Avaliação técnica dos aparelhos de fototerapia do serviço de neonatologia do Hospital Regional da Asa Sul, Brasília, Distrito Federal. [monografia de conclusão de Residência Médica em Pediatria]. Brasília (DF): HRAS; 2006.
12. Colvero AP, Colvero MO, Fiori RM. Fototerapia. Sci Med. 2005; 15(2):90-6.
13. Maisels MJ. Phototherapy. In: Maisels MJ, Watchko JF, editores. Neonatal jaundice. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 177-203.
14. Sá CAM, Santos MCP, Carvalho M, Moreira MEL. Eventos adversos associados à exossanguíneotransfusão na doença hemolítica perinatal: experiência de dez anos. Rev Paul Pediatr. 2009; 27:168-72.
15. Murahovschi, J. Pediatria: diagnóstico e tratamento. 6ª. ed. São Paulo: Sarvier (Almed); 2006.
16. Moro AND, Silvestri K, Silva RM. Avaliação clínica de icterícia: correlação com níveis séricos de bilirrubinas. Arq Catarin Med. 2004; 33(4):15-22.
17. Silva I, Luco M, Tapia JL, Pérez ME, Salinas JA, Flores J, et al. Fototerapia simples versus dupla no tratamento de recém-nascidos a termo com hiperbilirrubinemia não-hemolítica. J Pediatr. 2009; 85:455-8.
18. Perazzini DF, Mezzacappa MA, Rodrigues I, Mezzacappa F, Aranha A, Martins ST. Acompanhamento da icterícia neonatal em recém-nascidos de termo e prematuros tardios. Arch Pediatr Urug. 2009; 80(2):150-5.
19. Aycicek A, Kocyigit A, Erel O, Senturk H. Fototerapia e danos ao DNA de leucócitos. J Pediatr (Rio J). 2008; 84(2):141-6.
20. Cianciarullo MA, Cecon MEJ, Vaz FAC. Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. Rev Assoc Med Bras. 2003; 49(1):45-53.
21. Davutoglu M, Garipardic M, Guler E, Karabiber H, Erhan D. The etiology of severe neonatal hyperbilirubinemia and complications of exchange transfusion. Turk J Pediatr. 2010; 52:163-6.
22. Dzinovic A, Heljic S, Maksic H, Hrnjic Z. Neonatal hyperbilirubinemia: evaluation and treatment. Med Arh. 2002; 56(3S1):44-5.
23. Vicente LF, Pinto G, Serrano F, Soares C, Alegria AM. Profilaxia da isoimunização RhD: uma proposta de protocolo. Acta Médica Portuguesa. 2003; 16:255-60.
24. Madlon-Kay, DJ. Home health nurse clinical assessment of neonatal jaundice: comparison of 3 methods. Pediatrics. 2001; 155(5):583-6.
25. De Carvalho M. Tratamento da icterícia neonatal. J Pediatria. 2001; 77(1):71-80.
26. American Academy of Pediatrics. Subcomite on hiperbilirrubinemia in the newborn infant 36 or more weeks of gestation. Pediatrics. 2004; 114: 297-316.
27. Sakha SH, Gharehbaghi MM. Exchange transfusion in severe hyperbilirubinemia: an experience in northwest Iran. Turk J Pediatr. 2010; 52(4): 367-71.
28. Bastos F, Segre CAM, Britto JAA. Estudo Preliminar sobre a abordagem ao tratamento da icterícia neonatal em maternidades do município de São Paulo, Brasil. Rev Einstein. 2007; 5(1):56-62.

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA¹

BEHAVIORAL CHANGES IN EXPERIMENTAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Nyanne Beckmann Bosaipo*, Kelly da Silva*, Diego Padovan*, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa**, Claudia Maria Padovan***

RESUMO

Ratos criados em isolamento, uma forma de estresse afetivo, a partir do desmame e durante todo o período de desenvolvimento cerebral, têm sido utilizados como um modelo experimental de distúrbios mentais como a esquizofrenia. Diversas evidências demonstraram que o isolamento nestas condições induz alterações comportamentais como hiperatividade em um novo ambiente. Entretanto, em um estudo prévio não observamos essa alteração quando os animais foram testados na arena durante cinco minutos. No presente estudo avaliamos o padrão de exploração e atividade locomotora durante 20 minutos na arena, de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Dois grupos de ratos *Wistar* machos foram utilizados: grupo Isolado (1 animal/caixa, n=12) e grupo Controle (3 animais/caixa, n=12). Após dez semanas os ratos foram submetidos ao teste no campo aberto (arena) durante vinte minutos. A criação em isolamento induziu aumento significante do número de cruzamentos na periferia da arena ($F_{1,22}=14,08$; $p<0,001$) após cinco minutos de teste, enquanto o número de levantamentos foi significativamente reduzido no centro da arena ($F_{1,22}=12,48$; $p<0,01$). Foi observado também que os animais isolados apresentaram redução significante no tempo despendido no centro da arena ($F_{1,22}=11,11$; $p<0,0001$) e aumento na periferia da arena ($F_{1,22}=11,20$; $p<0,01$). Os resultados sugerem que ratos *Wistar* criados em isolamento a partir do desmame devam ser expostos ao novo ambiente por um tempo superior a cinco minutos para apresentarem hiperatividade. Além disso, o padrão de exploração com clara preferência pela periferia da arena apresentado pelos animais isolados pode refletir aspectos emocionais da esquizofrenia em humanos.

Palavras-chave: Isolamento social. Esquizofrenia. Campo aberto. Arena. Hiperatividade.

ABSTRACT

Rats reared in isolation, a kind of affective stress, from weaning and during the period of brain development, have been used as an experimental model of affective disorders like schizophrenia. Several evidence have shown that this isolation condition induces behavioral changes like hyperactivity in a novel environment. However, in a previous study we did not found this alteration when the animals were tested for five minutes in the arena. In this study we evaluate the pattern of locomotor and exploratory activity during twenty minutes in the arena in rats reared in isolation from weaning. Two groups of male *Wistar* rats were used: Isolated group (1 animal/cage, n=12) and Control group (3 animals/cage, n=12). After 10 weeks all animals were submitted to open field test (arena) for 20 minutes. Isolation rearing induced a significant increase in the number of crossings only at the periphery of the arena ($F_{1,22}=14,08$; $p<0,001$), that was observed after 5 minutes of test, while the number of rearings was significantly reduced at the center of the arena ($F_{1,22}=12,48$; $p<0,01$). It was also observed that isolated rats showed a significant reduction on the time spent at the center of the arena ($F_{1,22}=11,11$; $p<0,0001$) and an increase at the periphery of the arena ($F_{1,22}=11,20$; $p<0,01$). The results suggest that *Wistar* rats reared in isolation from weaning should be exposed to a novel environment for a time longer than 5 minutes to present hyperactivity. In addition, the pattern of exploration with a clear preference for the periphery of the arena showed by isolated rats may reflect emotional aspects of the schizophrenia in humans.

Keywords: Social isolation. Schizophrenia. Open field. Arena. Hyperactivity.

¹ Pesquisa realizada na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto-SP. Suporte Financeiro: auxílio Fundação Padre Albino e Bolsas Capes.

* Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP.

** Professora. Doutora na área de concentração em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado em Neurociência pela Universidade de Sheffield - Inglaterra e pela USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento (INeC-USP), Ribeirão Preto-SP. Editor Chefe da Revista "Ciência, Pesquisa e Consciência", Revista do curso de Medicina das FIPA. Docente (nível I) do conteúdo de Bioquímica do curso de Medicina das FIPA, Catanduva-SP. Contato: mlrosa.fameca@gmail.com

*** Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento (INeC-USP), Ribeirão Preto-SP.



INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais são doenças que afetam a cognição, a emoção e o comportamento. Com início precoce, frequentemente tendem a se estender cronicamente e assumir um perfil recorrente. Dentre essas doenças, a esquizofrenia é uma síndrome com múltiplos sintomas e tem sido analisada dentro de um modelo que engloba sintomas positivos, negativos, prejuízos cognitivos e sintomas afetivos¹⁻³.

Os estudos abordando distúrbios psiquiátricos nos últimos 40 anos, com foco nos sistemas cerebrais monoaminérgicos, contribuíram significativamente para a compreensão da patofisiologia destas doenças⁴⁻⁶. Desde a metade do século XIX, várias teorias surgiram a respeito das bases neurobiológicas subjacentes à esquizofrenia. As pesquisas se detiveram a implicar inúmeros neurotransmissores e outros componentes neuroquímicos com efeito direto na atividade neuronal. Dentre as teorias, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia foi a que apresentou argumentos mais consistentes e serviu de estímulo para pesquisas posteriores.

Entretanto, nos últimos anos tem sido reconhecida a contribuição de outros sistemas neurotransmissores como o glutamatérgico. Disfunções desse sistema têm sido observadas em uma série de distúrbios mentais⁷. Considerando a participação do glutamato nos mecanismos cerebrais envolvidos na esquizofrenia, foi demonstrado que uma redução na mediação glutamatérgica pode contribuir para a disfunção cognitiva que ocorre nesta neuropatologia⁷⁻¹⁰. Adicionalmente, têm sido sugerido que as sinapses glutamatérgicas podem ser o sítio das anormalidades primárias que ocorrem nesta doença com as alterações dopaminérgicas sendo secundárias às alterações glutamatérgicas¹¹. De acordo com Nieoullon e colaboradores⁷, o aprimoramento dos conhecimentos básicos a respeito das sinapses glutamatérgicas poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias direcionadas para reduzir as alterações patológicas associadas com as disfunções desta mediação.

Um grande conjunto de evidências sugere que a esquizofrenia é uma desordem que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC).

Traumas biológicos como doenças ou estresse durante os períodos de desenvolvimento cerebral podem contribuir para explicar os casos de esquizofrenia não associadas à herança genética^{12,13}.

A utilização de modelos experimentais, principalmente modelos genéticos nos quais genes associados à esquizofrenia são abolidos (*knocked out*), reduzidos (*knocked down*) ou exacerbados (*over-expressed*), fornece evidências de que tais manipulações produzem alterações significativas durante o neurodesenvolvimento¹⁴. Assim, os modelos experimentais em roedores têm sido amplamente utilizados como ferramentas importantes para o esclarecimento da patofisiologia de doenças psiquiátricas como a esquizofrenia¹⁵⁻¹⁷. Nesse sentido, os modelos têm auxiliado na identificação de alterações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais relacionadas às patologias e constituem elementos importantes para a compreensão das doenças, além de contribuírem para o aprimoramento dos diagnósticos e para o desenvolvimento de novos tratamentos¹⁸.

Considerando especificamente as alterações comportamentais, em modelos experimentais que utilizam roedores foram identificados comportamentos semelhantes aos sinais e sintomas da esquizofrenia. A agitação psicomotora, caracterizada como atividade locomotora exacerbada e a sensibilidade a drogas psicomiméticas poderiam ser categorizadas como sintomas positivos. Entre os sintomas negativos pode-se citar a retirada social, mensurável como uma redução da interação com animais da mesma espécie. No contexto cognitivo, os fatores identificados foram diminuição da memória de trabalho, déficits de atenção, alterações no registro sensorio-motor e em funções executivas, além de déficits cognitivos generalizados¹⁴.

O modelo experimental não farmacológico mais utilizado para o estudo da esquizofrenia é o isolamento social de ratos durante todo o período do desenvolvimento cerebral, que induz alterações semelhantes às aquelas que ocorrem no cérebro de humanos esquizofrênicos. Esta similaridade é observada em alterações morfológicas, neuroquímicas e comportamentais, como atrofia dendrítica no estriado¹⁹,

funções dopaminérgica e serotoninérgica aumentadas na área mesolímbica²⁰⁻²², hiperatividade em um novo ambiente²³, dificuldade de aprendizado discriminativo²⁴, déficits na memória de reconhecimento²⁵, e redução na inibição pelo pré-pulso - PPI^{26,27}, dentre outras alterações que mostram similaridade aos aspectos clínicos da esquizofrenia²⁸.

O isolamento social é considerado um estressor afetivo crônico^{29,30} e tem sido amplamente empregado como um modelo de esquizofrenia^{31,32}. Diversos estudos fornecem dados que dão suporte à utilização da exposição crônica de animais experimentais a um estressor, em condições rigorosamente determinadas, como modelo de depressão e esquizofrenia^{32,33}. Demonstrou-se que a exposição de um organismo a um tipo de estressor diariamente durante semanas causa déficits severos na memória hipocampal³⁴. Além disso, animais estressados cronicamente mostram alterações do comportamento motivado pelo medo³⁵. Pittenger e Duman³⁶ relacionam os efeitos do estresse também à neuroplasticidade no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e estriado ventral. Ainda, Kloet, Joëls e Holsboer³⁷ demonstraram correlações anatômicas e neuroquímicas dos déficits comportamentais induzidos por estresse crônico no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, como a remodelação estrutural e proliferação celular, modificações nos sistemas aminérgicos, de neuropeptídeos e corticosteróides. Adicionalmente, os autores sugeriram que a neurotransmissão glutamatérgica seria primordialmente responsável por mediar as alterações neuronais que ocorrem como consequência destas exposições.

Especificamente, animais submetidos ao estresse por isolamento social durante todo o período de desenvolvimento cerebral apresentam alterações comportamentais e fisiológicas semelhantes à esquizofrenia quando comparados aos animais criados em grupo³¹. Segundo Hatch e colaboradores³⁸, ratos isolados por um longo período tornam-se emocionalmente mais reativos e agressivos, além de apresentar uma endocrinopatia com hiperfunção do córtex da glândula adrenal. As observações de Weiss e colaboradores³² corroboram esses dados, sugerindo que o isolamento

social crônico aumenta a reatividade ao estresse e produz um hiperfuncionamento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) em ratos adultos. O trabalho de revisão de Fone e Porkess³¹ resumizou os efeitos comportamentais provocados pela criação de ratos em isolamento. Dentre eles, o comportamento exploratório, inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso, inibição latente, anedonia, interação social, dor, esquia passiva, déficits cognitivos, ansiedade, entre outros.

A hiperatividade em um novo ambiente observada em ratos isolados a partir do desmame é uma das alterações comportamentais mais reportadas pelos autores^{31,39}. Entretanto, há relatos de autores que não observaram hiperatividade em ratos criados em isolamento a partir do desmame quando testados no campo aberto por cinco minutos²⁷. Estes achados foram fidedignamente reproduzidos utilizando outros grupos de animais e outros experimentadores desse mesmo grupo de pesquisadores (resultados não publicados). A discordância destes resultados em relação aos descritos na vasta literatura relacionada é intrigante, especialmente considerando a hiperatividade neste modelo experimental de isolamento social. Os resultados de Rosa e colaboradores²⁷ foram discutidos por Fone e Porkess³¹, os quais sugeriram que a hiperatividade seria observada se os animais fossem mantidos no campo aberto por período superior a cinco minutos.

Outra análise comportamental foi realizada no campo aberto durante 15 minutos, após o mesmo protocolo de isolamento social. Novamente os animais controles (agrupados) e isolados apresentaram igual perfil de atividade exploratória e nenhuma diferença foi observada no decorrer da sessão de teste quando comparações pontuais (minuto a minuto) foram realizadas entre os dois grupos (artigo em preparação). Posteriormente, estudo semelhante avaliou também a atividade exploratória no centro e na periferia da arena, independentemente. Os resultados foram surpreendentes, uma vez que o perfil de exploração observado demonstrou um padrão mais ativo nos animais isolados contrapondo um padrão mais homogêneo nos animais agrupados. As atividades exploratórias, no centro e na periferia da arena, analisadas em cada minuto

reforçaram esta característica, uma vez que os animais isolados apresentaram um comportamento de "vai e vem" entre as duas áreas da arena, enquanto os animais agrupados exploraram uma ou outra área.

Diante do conjunto de evidências apresentado, a proposta deste trabalho foi investigar a hipótese de que ratos *Wistar* isolados durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade no campo aberto quando testados por tempo mais longo. Adicionalmente, também investigar o padrão desta hiperatividade, se ocorre de forma diferencial na área central ou periférica da arena.

OBJETIVO

Investigar o padrão de atividade exploratória durante 20 minutos no campo aberto (arena) de ratos isolados por 10 semanas a partir do desmame.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 filhotes de ratos *Wistar* machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto-SP. Imediatamente após o desmame, os filhotes (21 dias - $\pm 40g$) foram separados e divididos aleatoriamente em dois grupos (12 animais/cada): Grupo I (Isolado): alojados em caixas individualmente (um animal/caixa) e Grupo II (Agrupados/controle): alojados em grupos (três animais/caixa).

Todos os animais (isolados e agrupados) foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão (LNED) da FFCLRP-USP, com livre acesso a água e ração, sob ciclo regular claro/escuro (12h/12h), temperatura constante ($23^{\circ}C \pm 1$) e podendo ver, ouvir e sentir o cheiro dos outros animais.

A duração do isolamento foi de 10 semanas e neste período os animais "isolados" foram manipulados apenas 1x/sem. para limpeza das caixas (troca da maravalha e manutenção de água e ração), enquanto os "agrupados" foram manipulados 3x/sem. O contato do manipulador com o animal não excedia cinco segundos, tempo necessário para pegar o animal pela cauda e trocá-lo de caixa, a fim de evitar que o contato com o

manipulador tivesse qualquer interferência nos resultados do trabalho.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - USP-*campus* Ribeirão Preto-SP. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

Teste no campo aberto

Ao término do período de isolamento os animais, agrupados e isolados, foram submetidos ao teste comportamental para análise da atividade exploratória induzida pela criação em isolamento. O teste foi realizado utilizando uma arena circular (campo aberto) de 75cm de diâmetro, paredes de acrílico de 50cm de altura e com a base dividida em 12 quadrantes de mesma área. Os animais foram colocados no centro da arena e as respostas comportamentais filmadas durante 20 minutos. Os vídeos foram, posteriormente, analisados e os seguintes parâmetros registrados, a cada minuto, durante toda a sessão de teste:

- número de cruzamentos entre qualquer das áreas da base com as quatro patas (*crossings*) - Exploração Horizontal (Atividade Locomotora): este parâmetro foi avaliado separadamente no centro e na periferia da arena.

- tempo despendido no centro e na periferia da arena;

- número de levantamentos do corpo com as patas dianteiras erguidas (*rearings*) - Exploração Vertical: este parâmetro foi avaliado separadamente no centro e na periferia da arena.

Os resultados estão apresentados em blocos de tempo de cinco minutos (BT) e no tempo total de 20 minutos de teste.

Análise estatística

Os resultados obtidos para o grupo controle e isolado foram comparados utilizando ANOVA de medidas repetidas. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Padrão de atividade locomotora em ratos criados em isolamento a partir do desmame

A atividade locomotora (exploração horizontal) apresentada pelos dois grupos experimentais, agrupados e isolados, foi intensa nos primeiros minutos seguida de uma redução gradativa até o término da sessão de 20 minutos de teste na arena. Este perfil foi observado tanto no centro como na periferia da arena (Figura 1).

A criação em isolamento induziu aumento significativo da atividade locomotora, representada pelo número total de cruzamentos em 20 minutos de teste ($F_{1,22}=0,38$; $p<0,05$). Este aumento ocorreu apenas na região periférica da arena (73%; $F_{1,22}=14,08$; $p<0,001$), enquanto nenhuma diferença foi observada entre os grupos no centro ($F_{1,22}=0,13$; $p>0,05$). Esta característica pode ser observada quando o número de cruzamentos na periferia foi comparado entre os grupos em BTs de cinco minutos, e revela que a atividade locomotora dos isolados foi significativamente diferente dos agrupados a partir de cinco minutos de teste (BT2) (BT1: $F_{1,22}=3,08$; $p>0,05$; BT2: $F_{1,22}=23,53$; $p<0,0001$; BT3: $F_{1,22}=20,29$; $p<0,001$; BT4: $F_{1,22}=5,75$; $p<0,05$).

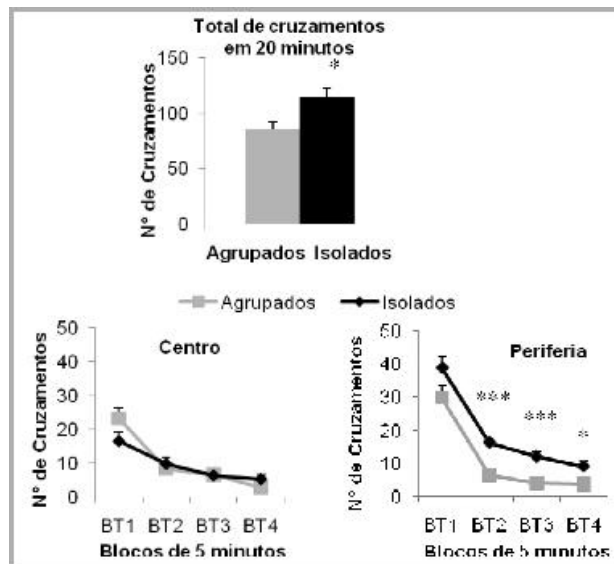


Figura 1 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade locomotora no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias do número de cruzamentos \pm EPM durante os 20 minutos de teste (Total de cruzamentos) e em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

Padrão de atividade exploratória em ratos criados em isolamento a partir do desmame

Na Figura 2 podemos observar que os animais isolados apresentaram uma discreta, mas significativa

redução na atividade exploratória total no campo aberto, demonstrada pelo número de levantamentos nos 20 minutos de teste ($F_{1,22}=0,27$; $p=0,05$). Entretanto, quando este número foi analisado separadamente no centro ou na periferia, observamos que a redução ocorreu no centro da arena, nos primeiros 15 minutos de teste (58%, $F_{1,22}=12,48$; $p<0,01$), sendo significativa em relação aos animais agrupados no BT1 ($F_{1,22}=14,95$; $p<0,001$) e BT3 ($F_{1,22}=7,54$; $p<0,05$). Em contraste, na periferia do campo aberto os animais isolados apresentaram aumento significativo no número de levantamentos no segundo e terceiro BT ($F_{1,22}=$; $p<0,05$).

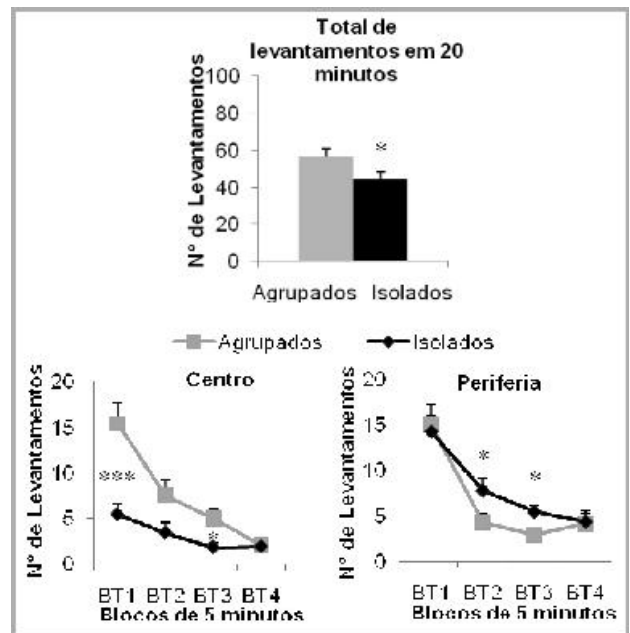


Figura 2 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade exploratória no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias do número de levantamentos \pm EPM durante os 20 minutos de teste (Total de levantamentos) e em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$

Tempo de permanência no centro e na periferia da arena em ratos criados em isolamento a partir do desmame

A análise do tempo despendido em cada região da arena durante os 20 minutos de teste demonstrou que o isolamento induziu uma redução significativa do tempo despendido no centro da arena (54%, $p=0,003$) quando estes animais foram comparados aos controles agrupados. Esta redução foi observada em todos os BTs ao longo dos 20 minutos de teste ($F_{1,22}=11,11$; $p<0,001$). Como esperado, o inverso foi observado em

relação ao tempo despendido na periferia da arena, onde os animais criados em isolamento apresentaram aumento significativo em relação aos controles (65%, $p=0,003$) em todos os BTs analisados ($F_{1,22}=11,20$; $p<0,01$).

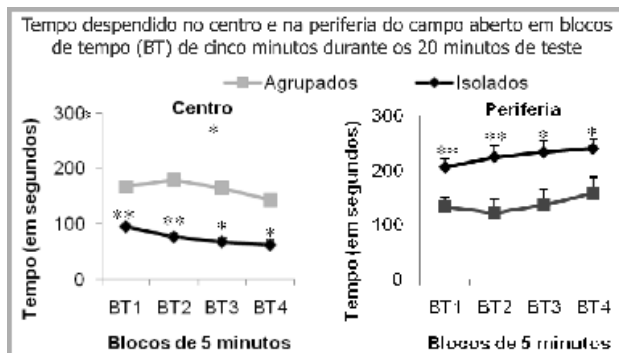


Figura 3 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a o tempo de permanência no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias \pm EPM do tempo de permanência em cada região da arena durante os 20 minutos de teste, avaliados em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$

DISCUSSÃO

Inúmeros estudos utilizam o isolamento social de ratos durante 8 a 10 semanas após o desmame, período do desenvolvimento cerebral, como modelo experimental para estudar doenças psiquiátricas como a esquizofrenia^{32,33,40,41}. Estes estudos têm demonstrado que este modelo experimental produz uma série de alterações comportamentais duradouras e reproduzíveis nos animais na idade adulta.

No presente trabalho avaliamos a atividade locomotora de ratos submetidos ao isolamento com o foco voltado para o perfil de exploração apresentado por esses animais em comparação com aqueles criados em grupo. Nossos resultados mostraram diferenças na atividade exploratória horizontal (atividade locomotora) no campo aberto como um todo e principalmente na periferia, enquanto as diferenças na frequência de levantamentos (exploração vertical) ocorreram no centro da arena. A hiperatividade locomotora, uma característica comportamental descrita para este modelo experimental, foi observada em nosso estudo e está de acordo com diversos achados da literatura a partir de estudos semelhantes^{31,32,42}. Este achado corrobora a ideia de que a hiperatividade observada no campo aberto é um dos efeitos clássicos do isolamento social quando aplicado na fase de desenvolvimento cerebral.

Apesar da consistência e qualidade dos experimentos que embasam essa tese, vários autores não puderam observar os mesmos resultados^{27,40}. A discrepância entre eles é intrigante se comparados com a vasta literatura relacionada especificamente à hiperlocomomoção utilizando o modelo do isolamento social. Assim, vários aspectos devem ser discutidos a respeito das diferenças encontradas entre os estudos experimentais.

Considerando inúmeras discussões na literatura, diferentes resultados obtidos a partir de testes comportamentais podem ser influenciados por um conjunto de fatores relacionados às características específicas de cada condição experimental. Sendo assim, a discordância entre os estudos citados poderia ser explicada por fatores que podem variar entre os laboratórios de pesquisa como a linhagem dos animais, os protocolos de manipulação, as condições do ambiente de isolamento, a sensibilidade ao ambiente de teste, ao teste comportamental em si e ao aparato utilizado, entre outros fatores, que podem ser decisivos na reprodução dos efeitos do isolamento.

Walsh e Cummins⁴³ revisaram em detalhes as diversas variáveis envolvidas no teste de animais no campo aberto e suas influências, além dos métodos de análise e interpretação dos resultados. Segundo esses autores, fatores genéticos e o *background* da experiência exercem efeitos diferenciais nos animais que culminam em manifestações comportamentais no teste do campo aberto. O trabalho discute, por exemplo, que características físicas do aparato como o tamanho, a cor, a forma, a subdivisão, a altura da parede, a textura do chão, o odor, a natureza e a localização da área de início, variam entre os estudos que utilizam o teste no campo aberto. Além disso, o ambiente circundante onde o teste é realizado é diversificado, com variações que incluem a natureza, a intensidade e a posição da luz, fontes de som e de odores, além da visibilidade e posição do observador. O mesmo ocorre com diversos detalhes do procedimento e das características individuais de observação de cada experimentador. Assim, ainda que tenham sido estabelecidas padronizações dentro de cada laboratório, não há uniformidade nos procedimentos e

resultados encontrados na literatura como um todo. De acordo com Walsh e Cummins⁴³, isso ocorre porque poucos trabalhos citam, além das informações sucintas do método, detalhes dos materiais e procedimentos específicos utilizados. Este aspecto tem importância fundamental, uma vez que a grande diversidade de protocolos experimentais existentes torna difícil a comparação entre os estudos e, em alguns casos, estes são impossíveis de interpretar⁴⁴. Outro aspecto desta diversidade é a dificuldade de reproduzir os achados descritos na literatura.

Devido a estas considerações encontramos dificuldades em comparar nossos resultados com aqueles da literatura. Estas foram feitas em relação a trabalhos que utilizaram protocolos experimentais semelhantes, embora encontremos entre eles variações com relação ao tempo de exposição ao novo ambiente, à luz utilizada no teste, aos parâmetros observados e à linhagem de animais utilizada.

Considerando o tempo de exposição ao novo ambiente, Fone e Porkess³¹ sugeriram que a hiperatividade locomotora poderia ter sido observada se os animais fossem expostos ao ambiente por um período mais longo, suficiente para registrar um perfil temporal. Nossos resultados corroboraram essa ideia quando observamos diferenças na atividade locomotora entre os grupos apenas a partir do segundo bloco de tempo, ou seja, após cinco minutos de teste. Nossos achados sugerem que ratos da linhagem *Wistar* necessitam ser expostos ao ambiente novo por um tempo mais longo que os cinco minutos para que a hiperatividade locomotora possa ser registrada.

Considerando a linhagem, Fone e Porkness³¹ discutem que as alterações comportamentais reportadas nos trabalhos da literatura só são reprodutíveis quando o isolamento social é aplicado à mesma linhagem de ratos. Dessa forma, ainda que duas linhagens diferentes sejam submetidas rigorosamente ao mesmo protocolo de isolamento e teste, as respostas comportamentais podem ser mais marcantes ou mesmo opostas. Weiss e colaboradores⁴², em experimentos com as linhagens *Lister hooded*, *Wistar* e *Sprague-Dawley*, observaram que diferenças na sensibilidade aos estímulos refletiam na

atividade locomotora. Este estudo comparou o comportamento destes animais, após o isolamento, durante 60 minutos no campo aberto. Uma vez que em nosso estudo a duração do teste foi de 20 minutos, nossos resultados podem ser comparados aos resultados obtidos na primeira etapa do experimento de Weiss. Entretanto, os autores registraram a atividade locomotora total nos 60 minutos de teste, não sendo possível concluir se a hiperatividade observada ocorreu uniformemente ao longo de todo o período ou em algum momento específico. Esta observação somente poderia ser feita se os resultados tivessem sido apresentados em blocos de menor tempo.

Arakawa⁴⁰ também utilizou a linhagem *Wistar* e não observou hiperatividade locomotora nos animais criados em isolamento. Como mencionado anteriormente, este efeito também não foi observado em nosso laboratório nos experimentos em que os animais foram testados no campo aberto por cinco minutos. Outra característica semelhante entre nossos achados e os de Arakawa foi o padrão mais ativo do comportamento exploratório dos animais isolados relatado pelo autor, também representado por um número maior de entradas no centro da arena em relação aos animais agrupados, embora não tenham sido observadas diferenças significativas.

Após a realização de quatro experimentos independentes utilizando a linhagem de ratos *Wistar* obtivemos resultados que, embora não estejam de acordo com a literatura, são consistentes (artigos em preparação). Observações semelhantes relacionadas às diferentes linhagens foram descritas por outros pesquisadores que estudaram o déficit de atenção no PPI^{27,39,45}. Estas características sugerem que ratos da linhagem *Wistar* criados em isolamento a partir do desmame podem ser mais resistentes em desenvolver a sensibilidade a estímulos necessária para induzir respostas comportamentais de hiperatividade e déficit de atenção. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que o protocolo experimental e os parâmetros empregados para análise neste estudo não tenham sido adequados para detectar estas diferenças.

Os resultados significantes entre os grupos experimentais encontrados aqui só foram visíveis porque os comportamentos foram analisados de forma independente na periferia e no centro da arena. Considerando o número de levantamentos (atividade exploratória), os animais isolados apresentaram diferença significativa em relação aos agrupados apenas no centro da arena. Entretanto, ao analisar estes dados em conjunto com os encontrados na periferia, a diferença entre os grupos não foi significativa. A análise realizada separadamente permitiu ainda observar que os ratos criados em isolamento permaneceram a maior parte do tempo do teste na periferia da arena, refletindo efeito ansiogênico do isolamento. Adicionalmente, estes achados permitem ainda estabelecer relações com os sintomas negativos da esquizofrenia, os quais estão associados à diminuição ou perda das funções normais como embotamento afetivo, restrições na fluência de raciocínio, anedonia (inabilidade em

experimental prazer), retraimento social, diminuição da motivação e da iniciativa.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram os dados da literatura no sentido de que ratos mantidos em isolamento a partir do desmame e durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade em ambiente novo (campo aberto ou arena). Entretanto, sugerem que ratos da linhagem *Wistar* criados nestas condições são mais resistentes a desenvolverem este comportamento e devem ser expostos ao ambiente por um período mais longo para que a hiperatividade possa ser detectada. Adicionalmente, os resultados sugerem que o isolamento de ratos desta linhagem apresenta um padrão de exploração com uma clara preferência pela periferia da arena. Assim, a análise separada deste comportamento na periferia e no centro da arena deve ser considerada quando ratos *Wistar* forem utilizados neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

1. Andreasen NC. Negative symptoms in schizophrenia: definition and reliability. *Arch Gen Psychiatry*. 1982; 39:784-8.
2. Ho BC, Andreasen NC. Positive symptoms, negative symptoms, and beyond. Current issues in the psychopharmacology of schizophrenia. In: Breier A, Tran PV, Herrera JM, Tollefson GD, Bymaster FP, editors. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 407-16.
3. Läge D, Egli S, Riedel M, Strauss A, Möller HJ. Combining the categorical and the dimensional perspective in a diagnostic map of psychotic disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2011; 261(1):3-10.
4. Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 1967; 113:1237-64.
5. Cowen PJ. A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*. 1990; 46:43-51.
6. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Rev Neurosci*. 2006; 7:137-51.
7. Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S, et al. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse. *J Neurochem*. 2006; 98(4):1007-18.
8. Pratt JA, Winchester C, Egerton A, Cochran SM, Morris BJ. Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. *Br J Pharmacol*. 2008; 153 Suppl 1:S465-70.
9. Nantso EK, Nguyen KT, Balcar VJ. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na⁺ / K⁺ -dependent glutamate transport. *J Biomedical Science*. 2005; 12:975-84.
10. Bauer D, Haroutunian V, Meador-woodruff JH, McCullumsmith RE. Abnormal glycosylation of EAAT1 and EAAT2 in prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010; 117:92-8.
11. Carlsson M, Carlsson A. Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr Bull*. 16:425-32.
12. Holmes DS. *Psicologia dos transtornos mentais*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
13. Miyamoto S, La Mantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA, et al. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*. 2003; 3(1):27-39.
14. Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry*. 2006; 59:1198-207.
15. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:775-90.
16. Seeburg PH, Single F, Kuner T, Higuchi M, Sprengel R. Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res*. 2001; 907:233-43.
17. Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR. Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacol*. 2004; 47(8):1117-34.
18. Hyman S, Chisholm D, Kessler R, Patel V, Whiteford H. Mental disorders. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editores. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd ed. Washington (DC): World Bank; 2001. p. 605-25.
19. Comery TA, Shah R, Greenough WT. Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum-evidence for association of morphological plasticity with early response gene-expression. *Neurobiol Learn Memory*. 1995; 63:217-9.
20. Jones GH, Hernandez TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992; 43:17-35.
21. Bardgett ME, Jackson JL, Taylor BM, Csernansky JG. The effects of kainic acid lesions on locomotor responses to haloperidol and clozapine. *Psychopharmacol*. 1998; 135(3):270-8.
22. Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Inglis W, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in

- striatal dopaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59:859-72.
23. Sahakian BJ, Robbins TW, Iversen SD. The effects of isolation rearing in the rat. *Anim Learn Behav.* 1977; 5:193-8.
24. Jones GH, Marsden CA, Robbins TW. Behavioural rigidity and rule-learning deficits following isolation rearing in the rat: Neurochemical correlates. *Behav Brain Res.* 1991; 43:35-50.
25. Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA, et al. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *European J Neuroscience.* 2006; 24:2894-902.
26. Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1993; 34:361-72.
27. Rosa ML, Silva RC, Moura-de-Carvalho FT, Brandão ML, Guimarães FS, Del Bel EA. Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(11):1691-6.
28. Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiol.* 1978; 15:339-43.
29. Kraeuchi K, Gentsch C, Feer H. Individually reared rats: alteration in noradrenergic brain functions. *J Neural Transm.* 1981; 50(2-4):103-12.
30. Blanchard RJ, Mckittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior.* 2001; 73:261-71.
31. Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents - Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(6):1087-102.
32. Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr N I, Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Bra Res.* 2004; 152:279-95.
33. Kim JW, Kirkpatrick B. Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. *Biological Psychiatry.* 1996; 40:918-22.
34. Sandi C. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Rev. Neurosci.* 2004; 5:917-30.
35. Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* 1999; 113:902-13.
36. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychobiol.* 2008; 33:88-109.
37. Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews, Neuroscience.* 2005; 6:463-75.
38. Hatch A, Balazs T, Wiberg GS, Grice HC. Long-term isolation stress in rats. *Science, New Series.* 1963; 142(3591):507.
39. Domeney A, Feldon J. The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect? *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59(4):883-90.
40. Arakawa H. The effect of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev Psychobiol.* 2003; 43:11-9.
41. Reynolds GP, Harte MK. The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochemical Society Transactions.* 2007; 35:433-6.
42. Weiss IC, Iorio LD, Feldon J, Domeney AM. Strain differences in the isolation-induced effects on prepulse inhibition of the acoustic startle response and on locomotor activity. *Behav Neurosci.* 2000; 114(2):364-73.
43. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin.* 1976; 83(3):482-504.
44. Stanford SC. The open field test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol.* 2007; 21(2):134-5.
45. Weiss IC, Feldon J, Domeney AM. Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. *Behav Pharmacol.* 1999; 10:139-49.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA DOS CUIDADORES DE CRIANÇAS PORTADORAS DA SÍNDROME DE DOWN

EVALUATION OF THE QUALITY OF LIFE OF CAREGIVERS OF DOWN SYNDROME CHILDREN

Nilce Barril*, Mirna Aparecida Teixeira**, Roberta Machado**

RESUMO

O atraso neuro-psicomotor observado nos portadores de Síndrome de Down exige dedicação e atenção maior de seus familiares. Essa atenção especial pode gerar sobrecarga preditiva de alterações na qualidade de vida de seus pais. Este estudo objetivou avaliar a qualidade de vida dos cuidadores primários de crianças com Síndrome de Down. Participaram da pesquisa 56 indivíduos divididos em dois grupos: um formado por cuidadores primários de pacientes com a Síndrome de Down (n=28) e o outro – o grupo controle - por cuidadores de crianças normais (n=28). A qualidade de vida de todos os participantes foi avaliada através do inventário *Short-Form SF-36*. Para a apresentação dos resultados utilizou-se estatística descritiva e o teste t de *Student* para verificar diferenças significativas entre os grupos, considerando-se o nível de significância de 95%. Os resultados mostraram redução estatisticamente significativa para os domínios capacidade funcional, estado geral de saúde e saúde mental do SF-36, no grupo de cuidadores de crianças com Síndrome de Down, em comparação ao grupo controle. Conclui-se, dessa forma, que cuidadores de pacientes com Síndrome de Down apresentam redução na qualidade de vida, possivelmente, em consequência da sobrecarga resultante do processo de cuidar. Isto indica a necessidade do oferecimento, ao cuidador de criança com Síndrome de Down, de informações referentes ao processo de cuidar e suporte emocional para que ele possa cuidar sem prejuízo de sua qualidade de vida.

Palavras-chave: Síndrome de Down. Qualidade de vida. SF-36. Cuidadores.

ABSTRACT

The neuro psychomotor delay observed in patients affected with Down Syndrome requires a greater dedication and attention from their relatives. This special attention can develop an overcharge predictive of changes in the quality of life of their parents. The purpose of this study was to evaluate the quality of life of children with DS primary caregivers. Took part to this research 56 individuals divided into two groups: one included children with Down Syndrome primary caregivers (n=28) and, another, the control group, included primary caregivers of normal children (n=28). The quality of life of all the participants was evaluated through the protocol Short Form SF-36. The Student test was used to compare the scores from the study and control groups considering a significance level of 95%. The study showed statistically significant for the domains physical function, general health and mental health status, of SF-36, in the children with Down Syndrome primary caregivers in comparison with the control group. The conclusion is that children with Down Syndrome primary caregivers have a reduced quality of life possibly due to the overcharge resulting from the process of taking care. This result suggests, the necessity of offering the children with Down Syndrome primary caregivers, information relating to the process of taking care and emotional support in order to taking care without losing their quality of life.

Keywords: Down syndrome. Quality of life. SF-36. Caregivers.

* Geneticista, doutora em Genética pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-São José do Rio Preto-SP), docente da disciplina de Genética Humana do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Responsável pelo Laboratório de Citogenética Humana e Ambulatório de Aconselhamento Genético do Hospital Emílio Carlos das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: medicinailce@gmail.com

** Médicas graduadas pelo curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.



INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD), ligada à trissomia do cromossomo 21 é a cromossomopatia mais frequente na espécie humana e constitui uma das causas principais de deficiência mental, compreendendo cerca de 18% do total de deficientes mentais em instituições especializadas. Cerca de uma em cada 800 crianças nasce com a síndrome e, entre as nativas e os fetos de mães com idade igual ou superior a 35 anos, a taxa é ainda maior¹⁻³.

O atraso do desenvolvimento neuro-psicomotor característico dos afetados exige estimulação, dedicação e atenção maiores, especialmente pelos pais. Essa atenção especial pode gerar alterações funcionais e emocionais na família, alterando, principalmente, a qualidade de vida dos pais⁴.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define qualidade de vida (QV) como "a percepção do indivíduo de sua posição na vida, no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações" e refere-se a indicadores objetivos e subjetivos de felicidade e satisfação⁵⁻⁹.

No caso da SD, as alterações na qualidade de vida dos pais estão relacionadas a diferentes fatores, tais como: a aceitação da deficiência do filho, a forma como a notícia foi recebida, a dificuldade de acesso a informações e alterações das rotinas da vida diária¹⁰.

No Brasil, são escassos os estudos a respeito da qualidade de vida dos cuidadores que convivem diariamente com os pacientes portadores da síndrome. No entanto, sabe-se que o desempenho funcional com consequente autonomia desses pacientes está diretamente relacionado ao suporte familiar recebido⁶⁻⁸.

OBJETIVOS

Diante do exposto, foi realizada a presente pesquisa, que teve por objetivo avaliar a qualidade de vida dos cuidadores primários de crianças com SD, utilizando-se o questionário genérico SF-36 (*The Medical Outcomes Study Short Form 36 - MOS-36 SF-36*).

MÉTODOS

Estudo transversal no qual foram avaliados 28 cuidadores primários de pacientes afetados pela SD que

frequentam o Ambulatório de Aconselhamento Genético do Hospital Escola Emílio Carlos, Catanduva-SP, acompanhando seus familiares sob cuidados, referidos aqui como grupo de cuidadores ou tratado. E outros 28 sujeitos cuidadores primários de crianças não portadoras de doenças crônicas, escolhidos intencionalmente para compor o grupo controle.

Os critérios adotados para a inclusão dos cuidadores em ambos os grupos foram: ser cuidador primário, ou seja, o membro da família mais próximo do paciente, encarregado pela principal responsabilidade do cuidado; apresentar condições físicas e mentais para fornecer os dados necessários, e concordar em participar do estudo^{11,12}.

A coleta dos dados foi realizada após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP. Após as autorizações necessárias, os cuidadores de crianças portadoras da SD e aqueles do grupo controle foram convidados a participar do estudo, e os que aceitaram foram devidamente instruídos a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a responderem as questões do inventário *The Medical Outcomes Study Short Form 36 (MOS-36 SF-36)*, versão brasileira. Trata-se de um instrumento de medidas genéricas para avaliar qualidade de vida, composto por 36 itens que abrangem oito domínios: capacidade funcional (CF) (com 10 itens); limitação por aspectos físicos (AF) (com quatro itens); dor (D) (com dois itens) e estado geral de saúde (EGS) (com cinco itens) que representam os componentes físicos do SF-36 e, vitalidade (VITA) (com quatro itens); aspectos sociais (AS) (com dois itens); limitação por aspectos emocionais (AE) (com três itens) e saúde mental (SM) (com cinco itens) que representam os componentes mentais do formulário¹¹⁻²².

O escore final obtido para cada domínio varia de 0 a 100, de modo que, quanto maior a pontuação, melhor é o estado de saúde do avaliado (zero: pior estado geral de saúde; 100: melhor estado de saúde). De modo geral, médias acima de 65 têm sido frequentemente observadas em diferentes aplicações do SF-36 e consideradas como indicador de bom estado de saúde.

Essa escala de cálculo é denominada *Raw Scale*, pois o valor final não apresenta unidade de medida; são números simbólicos que definem o grau de comprometimento que o indivíduo apresenta em cada domínio⁹⁻¹¹

Os resultados das variáveis gênero, idade, estado civil, número de filhos e tipos de vínculos foram analisados a partir de estatística descritiva e apresentados em números absolutos e porcentagens.

Foram calculadas médias, desvios-padrão, valor máximo e mínimo para os escores obtidos do SF-36 em ambos os grupos, e o teste t de *Student* para grupos independentes foi aplicado para verificar diferenças significativas entre os grupos, considerando-se o nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Na Tabela 1, estão apresentadas as características sociodemográficas obtidas para o grupo de cuidadores e para o grupo controle. No grupo tratado, todos os cuidadores eram do sexo feminino, a idade variou de 19 a 41 anos com média de 32 anos, o estado civil predominante foi o de casada (85%) e em 72% dos casos os pais tinham três filhos. Quanto à escolaridade, a maioria dos cuidadores não havia completado o ensino fundamental (78,5%). Os tipos de vínculos mais frequentes entre cuidadores e pacientes foram: mãe (81%), avó (14%) e tia materna (5%).

Tabela 1 - Distribuição das características sociodemográficas para o grupo controle e cuidador

Características	Grupo cuidador		Grupo controle	
	Pacientes	Cuidadores	Pacientes	Cuidadores
Gênero				
Masculino	15	0,0	16	0,0
Feminino	13	28	12	28
Idade	M= 4 anos	M= 32 anos	M= 4 anos	M= 30 anos
Estado civil				
casado	0	24	0	23
solteiro	0	1	0	2
outros	0	3	0	3
Número de filhos				
1 a 2	-	6	-	23
3	-	20	-	5
4 ou mais	-	2	-	-
Tipo de vínculo				
mãe	-	23	-	21
avó	-	4	-	7
outros	-	2	-	-
Escolaridade da mãe (anos)				
Ensino fundamental incompleto	-	22 (78,5%)	-	10 (36%)
Ensino médio completo	-	4	-	11
Ensino superior completo	-	2	-	7
Renda familiar em salários mínimos				
Até 1 salário mínimo	-	02 (7%)	-	01 (3,5%)
De 1 a 2 salários mínimos	-	13 (46,5%)	-	12 (42,5%)
De 2 a 5 salários mínimos	-	07 (25%)	-	10 (36%)
De 5 a 10 salários mínimos	-	06(21,5%)	-	05 (18%)

M= média

No grupo controle, 100% dos cuidadores eram do sexo feminino, a idade variou de 21 a 39 anos com média de 30 anos, o estado civil predominante foi o de casada (82%) e em 83% dos casos os pais tinham dois filhos. No que se refere à escolaridade, 36% dos cuidadores não havia completado o ensino fundamental. Os tipos de vínculos mais frequentes da amostra controle foram: mãe (74%) e avó (26%).

A renda mensal prevalente foi de um a dois salários mínimos no grupo de cuidadores (46,5%) e no controle (42,5%), considerando-se o valor do salário-mínimo vigente à época do levantamento de dados (R\$ 380,00).

Das 56 crianças constituintes da casuística, 31 eram do gênero masculino (55,4%) e 25 do feminino (44,6%). A idade variou de um a sete anos com média de quatro anos, tanto na amostra de cuidadores quanto na de controle.

A análise exploratória dos dados mostrou que, nos domínios referentes aos aspectos físicos e emocionais, os cuidadores apresentaram média de escores menores do que o grupo controle (média=75,89; média=64,19 e média=51,19; média=66,66, respectivamente) (Gráfico 1).

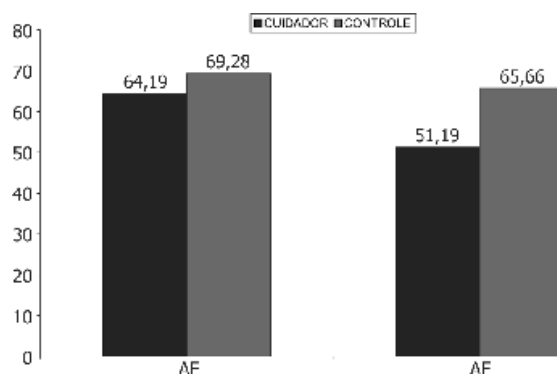


Gráfico 1 - Comparação dos escores dos domínios aspectos físicos e emocionais do SF-36 do grupo cuidador e controle
AF= aspectos físicos; AE= aspectos emocionais.

Os resultados obtidos permitiram verificar valores inferiores para todos os escores do SF-36 para o grupo de cuidadores em relação ao controle. No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas para os domínios capacidade funcional, estado geral de saúde e saúde mental (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios dos escores dos domínios do SF-36 obtidos para o grupo cuidador e controle

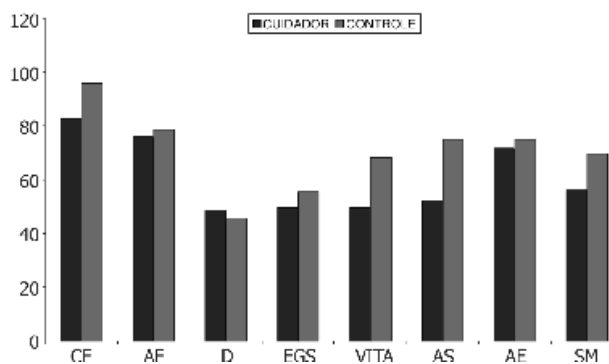
Variáveis	Grupo cuidador (n=28)				Grupo controle (n=28)				P
	Média	DP	Min	Max	Média	DP	Min	Max	
CF	82,67	19,97	25	100	95,71	6,19	75	100	0,0009*
AF	75,89	34,34	0,0	100	78,57	38,31	0,0	100	0,76
D	48,57	19,38	10	70	45,71	14,51	0,0	70	0,19
EGS	49,64	13,42	25	80	55,35	13,93	30	80	0,025*
VITA	49,64	11,93	25	65	68,21	7,95	40	80	0,29
AS	52,14	11,81	0,0	75	74,97	16,88	0,0	65	0,5
AE	71,60	35,86	0,0	100	74,97	40,30	0,0	100	0,21
SM	56,14	17,16	4	92	69,64	12,31	50	100	0,04*

N= número de indivíduos da amostra; Min= mínimo, Max= máximo; DP desvio padrão; CF= capacidade funcional; AF= aspectos físicos; D= dor; EGS= estado geral de saúde; VITA= vitalidade; AS= aspectos sociais; AE= aspectos emocionais; SM= saúde mental (*p≤0,05)

O melhor escore obtido nos dois grupos foi no domínio capacidade funcional, que reflete as limitações físicas impostas pelo estado geral de saúde em relação à realização de atividades físicas, como por exemplo, a execução de autocuidados. Por outro lado, os piores resultados observados foram no domínio dor corporal, que relata a gravidade da dor sentida, limitando seu funcionamento doméstico e laboral.

Os valores do desvio padrão permitem aferir a distância entre os valores individuais e a média. Na Tabela 2 observa-se também os valores máximos e mínimos de cada domínio obtidos nas respostas individuais.

Com exceção do domínio capacidade funcional do grupo controle, em que o maior valor encontrado foi 75, todos os demais domínios apresentaram, pelo menos, uma pessoa, em ambos os grupos, com valor mínimo inferior a 50, representativo de pior qualidade de vida.

**Gráfico 2** - Comparação da qualidade de vida no questionário SF-36 entre os indivíduos do grupo cuidador e controle

CF= capacidade funcional; AF= aspectos físicos; D= dor; EGS= estado geral de saúde; VITA= vitalidade; AS= aspectos sociais; AE= aspectos emocionais; SM= saúde mental

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que tanto no grupo tratado quanto no controle 100% dos

cuidadores eram do gênero feminino e maior prevalência do vínculo de mãe, o que corrobora as observações de vários outros estudos sobre qualidade de vida de cuidadores de pacientes afetados por doenças crônicas¹⁰⁻¹³.

Estes resultados, provavelmente, refletem o compromisso do matrimônio, assim como os traços culturais de nossa sociedade que impõem à mulher o dever e a obrigação de assumir a função de cuidadora de seus descendentes, especialmente daqueles mais frágeis e dependentes^{13,18}.

O inquérito SF-36 utilizado para avaliar qualidade de vida dos cuidadores de crianças dos grupos tratado e controle é uma medida genérica, considerada válida, segura, confiável e útil para aplicação em cuidadores primários¹¹.

Os resultados do presente estudo mostraram que as dimensões mais comprometidas da qualidade de vida dos cuidadores foram referentes aos domínios dor corporal (D), capacidade funcional (CF), estado geral de saúde (EGS) e saúde mental (SM). São domínios do SF-36 associados à percepção do estado geral de saúde ou enfermidade (D; CF; EGS) e estados emocionais, como depressão, ansiedade e desânimo (SM), o que pode estar refletindo a sobrecarga excessiva imposta aos cuidadores do grupo tratado. O conceito de sobrecarga refere-se à extensão com que cuidadores percebem sua emoção, saúde física, vida e status social, sendo ainda classificado em objetiva e subjetiva. A sobrecarga objetiva está associada ao tempo dispensado pelo cuidador no atendimento das necessidades diárias do cuidado, à dependência econômica e à privação das necessidades de outros membros da família em detrimento daquelas do paciente^{17,21,22}.

A classificação subjetiva de sobrecarga representa o estresse sofrido pelo cuidador sendo, portanto, relacionada aos aspectos emocionais que incluem a culpa, vergonha, baixa autoestima e autoproteção do familiar doente^{4,19}. Considerando que a prevalência de cuidadores da amostra com SD do presente estudo foi representada pelas mães, a convivência diária e a grande proximidade afetiva com

as crianças podem gerar sobrecarga, com conseqüente comprometimento da qualidade de vida através dos domínios dor corporal, capacidade funcional, estado geral de saúde e saúde mental. São resultados semelhantes aos observados por Allegretti e colaboradores²¹ e Martins e Pazin²⁰ em cuidadores de crianças com paralisia cerebral e SD.

Além disso, o processo de cuidar de crianças com SD exige esforços maiores do que aqueles dispensados a crianças não especiais, o que impõe à mãe uma sobrecarga maior, que pode ser geradora de alterações em sua saúde física e social. Sendo a SD uma condição congênita, norteadas por relações familiares marcadas por superproteção e preconceitos de diversas ordens, espera-se o desenvolvimento, entre cuidador e paciente, de interação emocional especial, fortalecida na síndrome e limitativa de crescimento individual^{22,23}.

Os aspectos relacionados às limitações nas atividades sociais (AS) podem ser conseqüentes à percepção, distorcida ou não, de falta de apoio e colaboração dos demais membros da família no processo de cuidar, o que pode desencadear, no cuidador, o desconforto e sentimento de solidão característico de pais de crianças especiais. Além disso, as famílias, usualmente, permanecem socialmente isoladas por medo da rejeição conseqüente do preconceito da comunidade em relação à síndrome¹³.

Outra possível explicação para os resultados deste estudo seria a gratificação do cuidador para com o paciente decorrente de culpa pela ocorrência da síndrome. A experiência com pacientes com SD e seus familiares, suas mães, em especial, indica que a gratidão por culpa determina uma relação negativa, tanto para o cuidador quanto para o paciente. O cuidador esquece de si e vive a vida do filho e este, na condição de superprotegido, não necessita enfrentar as limitações impostas pela síndrome. Assim, o foco passa a ser a SD e não as pessoas individualmente.

Os resultados mostram deterioração estatisticamente significativa do escore saúde mental no grupo de cuidadores. Esse dado, compatível com outros estudos em cuidadores de crianças especiais, ressalta a

importância do atendimento multidisciplinar ao cuidador primário, em especial ao fornecimento de suporte psicológico^{13,16,18-20}.

Finalmente, destaca-se a importância do oferecimento de apoio e informações aos familiares de portadores da SD com a proposição de estratégias de intervenção terapêutica apropriadas que possam auxiliar na inter-relação entre o cuidador e o paciente, de modo que haja uma percepção individual quanto aos aspectos envolvidos na qualidade de vida e a sobrecarga física e emocional impostas pela ocorrência da síndrome. Quanto mais conhecimento o cuidador apresentar sobre as comorbidades associadas à SD e as estratégias a serem utilizadas no processo de cuidar, identificar e compreender seus sentimentos em relação ao paciente, maiores serão os benefícios para a família como um todo, inclusive para o paciente, pois a literatura sugere que os fatores ambientais relacionados às atitudes do cuidador podem influenciar diretamente no desenvolvimento do desempenho funcional de crianças afetadas²⁴⁻²⁶.

Ressalta-se também, que a quantidade e complexidade dos fatores que interferem no cuidador justificam a necessidade da realização de estudos adicionais que auxiliem na identificação das particularidades do cuidador e do cuidado dispensado ao paciente com SD.

CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, é possível concluir que os cuidadores primários de crianças afetadas pela SD apresentam piora da qualidade de vida quando comparados aos cuidadores de crianças de igual idade e sem problemas crônicos de saúde. Isto sugere a necessidade do oferecimento, ao cuidador de criança com SD, de informações referentes ao processo de cuidar e suporte emocional para que ele possa cuidar sem prejuízo de sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

1. Mikkelsen M, Poulsen H, Nielsen K. Incidence, survival and mortality in Down syndrome in Denmark. *Am J Med Genet.* 1990; 7:75-8.
2. Moreira LM, El-Hani CN, Gusmão FAF. A síndrome de Down e sua patogênese: considerações sobre o determinismo genético. *Rev Bras de Psiquiatria.* 2000; 22:96-9.
3. Nussbaum RL, Mc Innes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: genética médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
4. Martins T, Ribeiro JP, Garrett C. Estudo de validação do questionário de avaliação da sobrecarga para cuidadores informais. *Psic Saúde & Doenças.* 2003; 4(1):131-48.
5. Minayo MCS, Hartz ZMA, Buss PM. Qualidade de vida e saúde: um debate necessário. *Cien Saúde Coletiva.* 2000; 5(1):7-18.
6. Goldbeck L. The impact of newly diagnosed chronic pediatric conditions on parental quality of life. *Quality of Life Research.* 2006; 15:1121-31.
7. Eiser C. Children's quality of life measurements. *Arch Disease in Childhood.* 1997; 77(4):356-9.
8. Guyatt GH, Feeny DH, Patrick DL. Measuring health-related quality of life. *Annals of Internal Medicine.* 1993; 118(8):622-9.
9. The Whoqol Group. The World Health Organization quality of life assessment (WHOQL): position paper from the world health organization. *Social Science & Medicine.* 1995; 41(10):1403-9.
10. Buzatto LL, Beresin R. Qualidade de vida dos pais de crianças portadoras da síndrome de Down. *Rev Einstein.* 2008; 6(2):175-81.
11. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol.* 1999; 39(3):143-50.
12. Ferraz MBE, Ciconelli RM. Avaliação da qualidade de vida. In: Levy JA, Oliveira ASB, organizadores. *Reabilitação em doenças neurológicas: guia terapêutico prático.* São Paulo: Atheneu; 2003. p. 231-7.
13. Nakatani, AYK, Souto, CCS, Paulette, LM, Melo, TS, Souza, MM. Perfil dos cuidadores informais de idosos com déficit de autocuidado atendidos pelo Programa de Saúde da Família. *Revista Eletrônica de Enfermagem,* 2003,5(1):15-20. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/Revista>.
14. Aranha LLM, Mirón Canelo JA, Alonso Sardón M, Del Pino Montes J, Sáenz González MC. Qualidade de vida relacionada à saúde em espanholas com osteoporose. *Rev Saúde Pública = J Public Health.* 2006; 40(2):298-303.
15. Jönsson AC, Lindgren I, Hallström B, Norrving B, Lindgren A. Determinants of quality of life in stroke survivors and their informal caregivers. *Stroke.* 2005; 36(4):803-8.
16. Westphal AC, Alonso NB, Silva TI, Azevedo AM, Caboclo LOSF, Garzon et al. Comparação da qualidade de vida e sobrecarga dos cuidadores de pacientes com epilepsia por esclerose mesial temporal e epilepsia mioclônica juvenil. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2005; 11(2):71-6.
17. Carr A. Adults measures of quality of life. *Arthritis Rheum.* 2003; 49(5S):113-33.
18. Cattani RB, Girardon-Perlini NMO. Cuidar do idoso doente no domicílio na voz de cuidadores familiares. *Rev Eletrônica Enferm.* 2004; 6(2):254-71.
19. Zarit SH, Reever KE; Bach-Peterson J. Relatives of impaired elderly: correlates of feeling of burden. *Gerontologist.* 1980; 20:649-55.
20. Martins MRI, Pazin AC. Desempenho funcional de crianças com síndrome de Down e a qualidade de vida de seus cuidadores. *Rev Neurociên.* 2007; 15(4):297-303.
21. Allegretti ALC, Mancini MC, Schwatzman JS. Estudo do desempenho funcional de crianças com paralisia cerebral diparética espástica utilizando o PEDI. *Arq Bras Paralis Cereb.* 2004; 1:35-40.
22. Bulger MW, Wandersman A, Goldman CR et al. Burdens and gratifications of caregiving: Appraisal of parental care of adults with schizophrenia. *AM J Orthopsychiatry.* 1993; 63:255-65.
23. Turró-Garriga O, Soler-Cors O, Garre-Olmo J, López-Pousa S, Vilalta-Franch J, Monserrat-Vila S. Distribución factorial de la carga en cuidadores de pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2008; 46(10):582-8.
24. Badia Llach X, Lara Surinach N, Roset Gamisans M. Calidad de vida, tiempo de dedicación y carga percibida por el cuidador principal informal del enfermo de Alzheimer. *Atención Primaria.* 2004; 34(4):170-7.
25. Sales E. Family burden quality of life. *Qual Life Res.* 2003; 12(Suppl):S33-S41.
26. Fink VS. The influence of family resources and family demands on the strains and well being of care giving families. *Nurs Res.* 1995; 44(3):139-46.

ENTEROPARASITOSE EM MANIPULADORES DE DINHEIRO

ENTEROPASITOSIS IN COLLECTORS OF MONEY

Filipe Augusto Fornari Montanholi*, Roberta Vieira do Valle Gonçalves*, Lair Merlo**, Márcia Alcântara Santos***, Manzélio Cavazzana Junior****

RESUMO

Nas Américas, especialmente no Brasil, populações analisadas em estudos epidemiológicos revelam que mais de 50% dessas pessoas possuem algum tipo de parasitose. Entre todos os meios de transmissão destas doenças, a veiculação de agentes infecciosos e parasitários por cédulas de dinheiro é considerada uma das mais eficientes pelo frequente contato com a população humana. Baseado neste conjunto de informações, analisamos cerca de 500 cédulas, obtidas de diversas casas comerciais em vários bairros da periferia e centro na cidade de Catanduva-SP, quanto a presença de parasitas e outros agentes infecciosos e também os profissionais que trabalham diretamente com dinheiro. As análises mostraram a presença de bactérias do grupo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e coliformes, e também ovos embrionados viáveis de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma* sp e cistos *Microsporidium* sp, grupos bacterianos e parasitários comumente encontrados em fezes humanas. Todos os profissionais analisados, estavam infestados com parasitas, sendo a maioria com os descritos anteriormente. A análise dos dados evidencia claramente que o dinheiro, devido a sua textura e grande circulação entre a população tem uma considerável capacidade de armazenar e veicular diversos grupos microbianos e também parasitas oriundos, principalmente, de fezes humanas, evidenciando a necessidade de prestar informações a profissionais que trabalham diretamente com dinheiro quanto à insalubridade e os cuidados com higiene.

Palavras-chave: Dinheiro. Doenças infecciosas. Doenças parasitárias. Coliformes fecais. Contaminações alimentares.

ABSTRACT

In America, especially in Brazil, populations analyzed in epidemiologic studies displayed more than 50% of that people have some type of parasitosis. The epidemiologic inquiries perform in Brazilian territory indicate that each year have a expressive growth of infectious and parasitic diseases principally in child in school age and that nowadays aren't restrict to destitute population. Among all the transmission means of those diseases the diffuse of the infectious and parasitic agents for money note is consider a one of the most efficient for frequent contact with human population. Based in conjunct of this information we analyzed approximately 500 notes get in divers business establishment in many periphery districts and in downtown of Catanduva-SP. The material removed of the notes were analyzed by parasitological and microbiological classic methods, showed the presence of bacterium of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* and others enterobacterial groups, and also embryonated and viable eggs of *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma* sp, *Microsporidium* cysts, bacterial and parasitic groups usually founded in human excrements. All the analyzed notes were detecting an elevated index of total coliforms and all professionals analyzed were infested with parasites, being the majority with the described ones previously. The data analyzed clearly evidence that the money, due to your texture and circulation among the population have a considerable capacity of garner and to diffuse many microbial groups and also parasites derived principally of human excrement and evidence the necessity of a personal hygiene after the contact whit money don't care about your origin.

Keywords: Money. Infectious disease. Parasite disease. Fecal coliforms. Food contaminations.

* Médicos graduados em 2010, pelo curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

** Técnico do Laboratório de Parasitologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

*** Doutora em Ciências - Biologia da relação parasita-hospedeiro. Docente da disciplina de Microbiologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: santosma@usp.br

**** Doutor em Ciências - Biologia da relação parasita-hospedeiro. Docente da disciplina de Parasitologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: manzelio@usp.br



INTRODUÇÃO

As parasitoses estão presentes em mais de 50% da população humana. Além do grande impacto econômico para o sistema de saúde, o déficit orgânico também resulta em efeitos negativos no desenvolvimento normal de crianças, principalmente em relação ao aprendizado e também na capacidade de trabalho nos adultos¹⁻³. Os inquéritos epidemiológicos realizados no território brasileiro indicam que a cada ano há um aumento significativo das doenças infecciosas e parasitárias, principalmente em crianças em idade escolar e que atualmente não está restrita a população carente. Entre todos os meios de transmissão destas doenças a veiculação de agentes infecciosos e parasitários por cédulas de dinheiro é considerada uma das mais eficientes pelo frequente contato com a população humana. A presença de ovos e cistos de parasitas em dinheiro é constante e os profissionais que manipulam cédulas e moedas frequentemente têm suas mãos infestadas por ovos ou cistos destes parasitas. Neste estudo, verificamos a presença de agentes parasitários e infecciosos em cédulas que circulam no comércio de uma maneira geral e também a presença de parasitoses em profissionais que manipulam diretamente dinheiro.

METODOLOGIA

Coleta do material

As cédulas foram obtidas no ambiente de trabalho dos manipuladores de dinheiro analisados neste estudo, ou seja, no comércio, bancos e praças de pedágios próximos a cidade de Catanduva-SP. Para a escolha dos pontos de coleta foram observados os níveis socioeconômicos e também a distância de cada ponto, procurando abranger o máximo possível a área relativa ao município.

Análise das cédulas

As cédulas foram separadas em grupos de três unidades em um *erlenmeyer* com água e submetidas à agitação por 30 minutos. Após este tempo, as cédulas foram cuidadosamente raspadas com uma lâmina de vidro para retirar o material contido em sua superfície e o material centrifugado a 8000 rpm/5min. Os métodos utilizados para pesquisa e identificação de enteroparasitas foram os métodos direto para pesquisa de trofozoítos

de protozoários em fezes diarreicas, o método de FAUST⁴⁻⁷ para pesquisa e identificação de ovos leves de helmintos e cistos de protozoários, o método de sedimentação espontânea⁸⁻¹⁰ para ovos leves e pesados de helmintos e cistos de protozoários, o método de Rugai¹¹ para pesquisa e identificação de larvas de helmintos, e o método de Ziehl Neelsen modificado¹¹ para pesquisa e identificação de *coccídios* intestinais, em amostras de fezes, utilizando-se uma concentração prévia das amostras pelo método de centrífugo-sedimentação com formol-éter.

Exame parasitológico em manipuladores de dinheiro

Neste estudo, 16 profissionais foram selecionados após uma observação prévia de comportamento na sua rotina de trabalho quanto à frequência de lavagem das mãos, e a frequência com que estes profissionais levam a mão a boca durante o expediente.

Foram coletadas três amostras de fezes semanalmente para a realização do exame parasitológico pelos métodos de Faust, Hoffman e Rugai^{12,13}.

Análise microbiológica

TSI

É utilizado para diferenciação de *Enterobacteriaceae*, especialmente para diferenciar *Salmonella* de outras bactérias entéricas. O método foi utilizado de acordo com Macfaddin⁸.

RUGAI

Este método é baseado em um meio de cultura diferencial destinado à triagem (identificação presuntiva) de enterobactérias oxidase negativas e os procedimentos forma realizados de acordo com Koneman e colaboradores².

EMB

O meio de cultura EMB é indicado para confirmar a presença de bactérias do grupo coliformes e foi utilizado de acordo com Murray⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As parasitoses humanas são comuns em todas as regiões do planeta. Dados da *World Health*

Organization (WHO), mostram que os índices de infecções em humanos vêm caindo a cada ano, devido às campanhas de educação sanitária, porém ainda estão longe de serem controladas. Desde a década de 1970, um grande número de inquéritos epidemiológicos foram publicados em diversas regiões do planeta. No Brasil, esses estudos indicaram que mais de 50% da população está infectada por algum tipo de parasitose.

Quanto à forma de propagação destas parasitoses na população, as fomites sempre foram consideradas os meios mais eficientes e dentre elas o dinheiro circulante na população. A cidade de Catanduva-SP possui uma população estimada em 100 mil habitantes entre áreas urbanas e rurais, com um comércio bastante ativo e diverso, por onde circulam mais de 30 mil pessoas por dia, trocando de mãos cédulas de dinheiro, permitindo, assim, a disseminação da diversidade bacteriana e também parasitária possivelmente encontradas nestas notas. As análises microbiológica e parasitológica das cédulas revelaram a presença de bactérias dos grupos *Staphylococcus* (Figura 1A), *Streptococcus*, *Bacillus* e coliformes (Figura 1B), e também ovos embrionados viáveis de *Ascaris lumbricoides* (Figura 3A), *Ancylostoma* sp (Figura 3B) e cistos de *Microsporidium*, grupos bacterianos e parasitários comumente encontrados em fezes humanas. Em todas as amostras analisadas foi detectado um alto índice de coliformes totais e fecais identificados por testes bioquímicos como Rugai (Figura 2A), TSI (Figura 2B) e EMB (Figura 3).

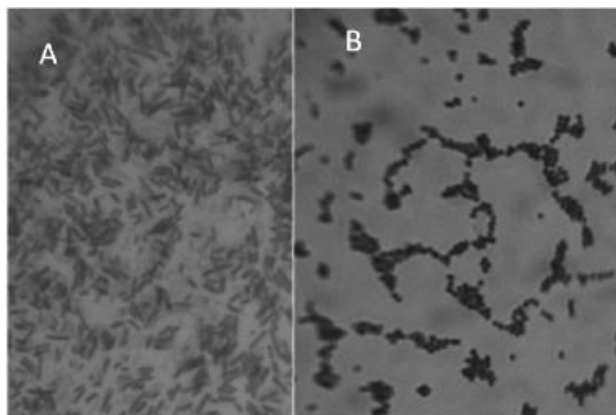


Figura 1 - Coloração pelo método de GRAM do material contido na superfície das cédulas

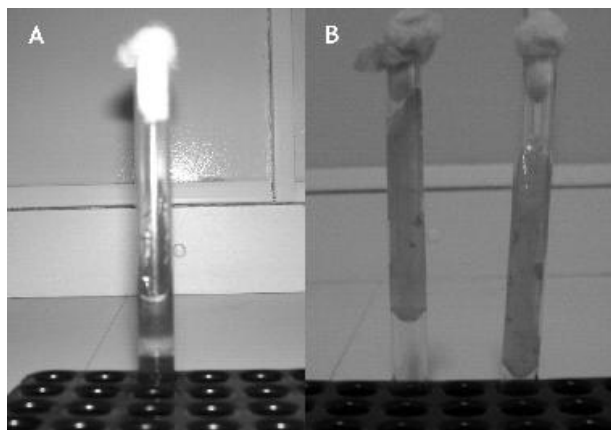


Figura 2A - Teste de Rugai

Figura 2B - TSI



Figura 3 - Teste EMB confirmatório para *E. coli*

Além do grupo coliforme, estavam presentes bactérias pertencentes aos grupos *Staphylococcus*, principais responsáveis por contaminações alimentares, e *Streptococcus*, que fazem parte das floras bacterianas das regiões orofaríngea e nasal de humanos.

Apesar da pequena amostragem de notas infestadas com ovos e cistos de parasitas intestinais, devemos considerar que a quantidade de material fecal acumulado em uma única nota é pequena (Figura 4), porém torna-se significativo quando comparado ao número de ovos existente por grama de fezes em uma pessoa infectada. Mesmo com a grande abrangência avaliada dentro do município, não foi possível determinar a origem dos ovos encontrados devido à grande rotatividade destas notas. A análise dos dados evidencia claramente que o

dinheiro, devido a sua textura e grande circulação entre a população tem uma considerável capacidade de armazenar e veicular diversos grupos microbianos e também parasitas, todos oriundos principalmente de fezes e saliva humanas.

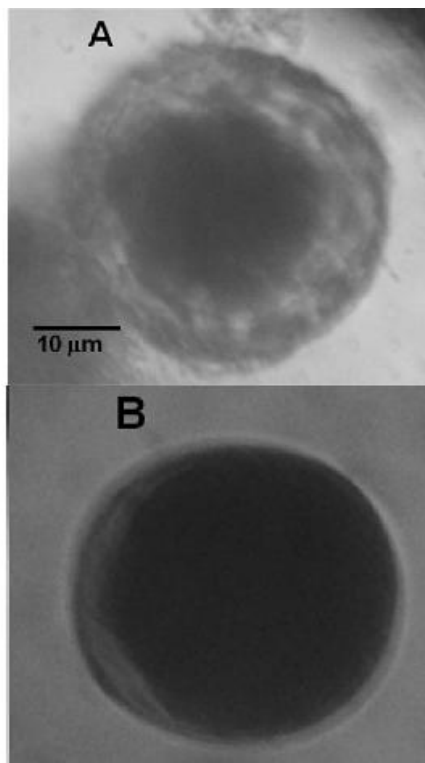


Figura 4 - Ovos de enteroparasitas encontrados na superfície das cédulas (A) ovo corticado e viável de *Ascaris lumbricoides* e (B) ovo de *Ancylostoma sp*

Foram encontrados também partículas de poeira, esporos de fungos e fibras vegetais e resíduos de lipídios (Figura 5). Todos os resíduos orgânicos encontrados em presença de umidade permitem, além da fixação, a multiplicação de diversos grupos bacterianos e fungos, aumentando, assim, a infestação da superfície da cédula.

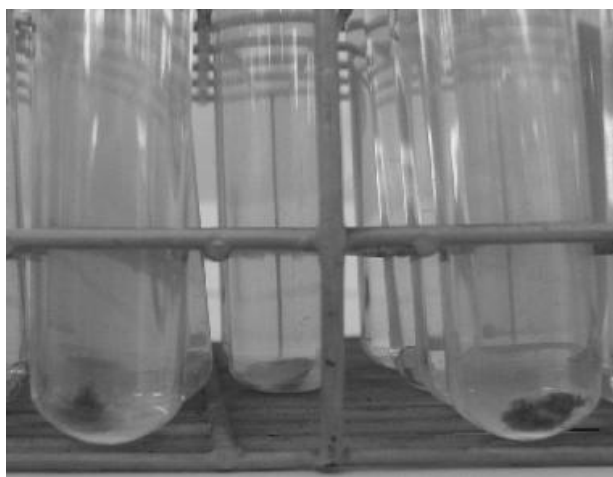


Figura 5 - "Pellets" obtidos após a centrifugação do material contido em cada cédula

As técnicas utilizadas para o exame parasitológico de fezes realizado nos profissionais que trabalham diretamente com cédulas mostrou que, dentre os 16 profissionais que aceitaram realizar os exames parasitológicos, 6 estavam poliparasitados por cistos de *Giardia lamblia*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e cistos de *Entamoeba coli*; 2 estavam poliparasitados com *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba coli*; 5 monoparasitados com *Ascaris lumbricoides*; e 3 apresentavam larvas rabditoides de *Ancylostoma duodenalis*. Estas análises demonstram que, além destes profissionais estarem infestados com as parasitoses mais comuns entre os brasileiros, apresentam índices altamente elevados quando comparados aos ocorridos nas Américas. Estes índices, em relação à ocorrência na população em geral, sugerem que estes profissionais, apesar de muitas vezes estarem alocados em uma classe social mais privilegiada, estão inclusos também na "população de risco" para as parasitoses intestinais, da mesma forma que as populações mais humildes que não desfrutam de saneamento básico.

O conjunto dos dados se completa, uma vez que os indícios de parasitas encontrados no dinheiro foram os mesmos encontrados em manipuladores. Podemos sugerir que o dinheiro, de fato, pode transmitir parasitoses para seres humanos. Assim, é necessária a higiene pessoal após o contato com dinheiro, não importando sua origem, além dos cuidados necessários em relação às pessoas que trabalham diretamente com ele, como bancários e comerciantes, caixas de lojas, supermercados e, principalmente, manipuladores de alimento em bares, restaurantes e até mesmo no ambiente doméstico. As questões legais que tratam das profissões insalubres não contemplam estes profissionais e neste estudo foi demonstrado que o risco à saúde para estas pessoas é maior.

O monitoramento de pessoas que trabalham com dinheiro deve ser constante, no tocante a exames parasitológicos, campanhas informativas e até mesmo cursos que instruem como devem ser os cuidados para quem desenvolve esta atividade.

Agradecimentos

A Fundação Padre Albino pelo apoio a este estudo.

REFERÊNCIAS

1. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Stockbrine NA. Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington-DC: American Society for Microbiology; 2003.
2. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5^a. ed. Buenos Aires: Medica; Panamericana; 1997.
3. De Carli GA, Saraiva PJ, Issler MS. Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses. RBAC. 1997; 29(1):24-8.
4. Faust EC, D'Antoni JS, Odan W, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cyst and helminth eggs in feces. I preliminary communication. Am J Trop Med. 1938;18:169-83.
5. Ferraroni MJR, Marinho HA, Nagahama D, Rocha YR, Silva NB, Castro JS. Prevalência de enteropatias na cidade de Manaus. J Pediatr. 1991; 67(1/2):24-8.
6. Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of cryptosporidium oocysts and giardia cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001; 43(2):109-11.
7. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in Schistosoma mansoni. Puerto Rico. J Publ Health Trop Med. 1934, 9:283-98.
8. Macfaddin JF. Media for the isolation - cultivation - maintenance of medical bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985. v. 1
9. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington, D.C: Am Soc Microbiol; 1995.
10. Nolla AC, Cantos GA. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Cad Saúde Pública. 2005; 21(2):641-5.
11. Rey L. Parasitologia. 4^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
12. World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases; intestinal Parasites Control, Geographical Distribution. [acessado em 2008 jun 10]. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>
13. Stephenson L; Holland C. The impacts of helminth infections on human nutrition – Schistosomes and soil-transmitted helminths. London: Taylor & Francis; 1987.

EFEITOS DO ESTRESSE AFETIVO CRÔNICO SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO HIPOCAMPO

EFFECT OF CHRONIC AFFECTIVE STRESS ON THE GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS

Fábio Henrique Limonte*, Marina Teixeira Ramalho Pereira**, Melina Mizusaki Iyomasa***, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa****

RESUMO

O estresse afetivo precoce, que ocorre no início da vida, parece expor um indivíduo a um maior risco para muitas doenças mentais como depressão e estresse pós-traumático. Foi demonstrado o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica nessas doenças através de diferentes receptores em diversas áreas cerebrais. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações induzidas pelo estresse afetivo por separação materna (SM) sobre a expressão dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, GluR1 e GluR2, no hipocampo de ratos. Filhotes de ratos *Wistar* machos (n=10) foram submetidos a uma separação diária (3h) de suas mães de PND1-21, enquanto os controles (n=11) foram mantidos com suas mães. No dia do desmame (PND21) os filhotes foram alojados (4/caixa) durante 5 semanas, quando foram profundamente anestesiados, perfundidos com paraformaldeído 4% e seus cérebros removidos. A expressão das subunidades GluR1 e GluR2 foi avaliada por imuno-histoquímica (n=6/grupo) no hipocampo (CA1, CA2 e hilus do giro denteado) e os grupos comparados através do teste "t" de *Student* (significante quando $p \leq 0,05$). A SM não induziu qualquer alteração no número de células imunopositivas para GluR1 na área do hilus do giro denteado quanto comparados aos controles. Entretanto, uma redução de GluR1 foi observada na área CA3. Para GluR2, uma redução significativa no número de células imunopositivas foi encontrada na área CA3 (24%, $p=0,001$) em contraste com um aumento significativo no hilus do giro denteado (36%, $p=0,02$) e na área CA1 (27%, $p=0,01$) do hipocampo. Os resultados demonstram que o estresse afetivo crônico pela SM induz alterações permanentes nas vias glutamatérgicas de resposta a esta forma de estresse, sugerindo que estas alterações podem contribuir para desencadear o desenvolvimento de processos patológicos como depressão maior e estresse pós-traumático na vida adulta.

Palavras-chave: Estresse. Separação materna. Receptores AMPA. Imuno-histoquímica. Hipocampo.

ABSTRACT

Early life stress seems to put an individual at a greater risk for many mental disorders such as depression and posttraumatic stress. Glutamatergic neurotransmission has been shown to be involved in these disorders through different receptors in several brain areas. The aims of this study were to investigate the changes induced by maternal separation (MS) affective stress on the expression of glutamate AMPA receptors, GluR1 and GluR2, in the hippocampus of rats. Pups of male *Wistar* rats (n=10) underwent a daily-3h separation from their mothers from PND1-21 and the controls (n=11) were left undisturbed. At the weaning day (PND21) the pups were housed (4/cage) for 5 weeks, when were deeply anaesthetized, perfused with paraformaldehyde 4% and their brains removed. The expression of GluR1 and GluR2 subunits was evaluated by immunohistochemistry (n=6/group) on the hippocampal formation (CA1, CA2 and hilus of dentate gyrus) and the groups compared by Student t-test (significant when $p \leq 0.05$). MS induced no changes in the number of GluR1 immunopositive cells in the hilus of dentate gyrus when compared to controls. However, a decrease of GluR1 was found in CA3. For GluR2 a significant decrease of these cells was observed in the number immunopositive cells in CA3 (24%; $p=0.001$) in contrast with a significant increase in the hilus of dentate gyrus (36%, $p=0.02$) and CA1 (27%; $p=0.01$) of the hippocampus. The results show that chronic affective stress by MS induces permanent changes on the glutamatergic pathways of response to this kind of stress suggesting that these changes may contribute to triggering the development of pathological processes such as major depression and posttraumatic stress in adulthood.

Keywords: Stress. Maternal separation. AMPA receptors. Immunohistochemistry. Hippocampus.

¹ Este projeto contou com o apoio financeiro da FAPESP e da Fundação Padre Albino.

* Discente do 6º ano do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento-USP.

** Discente do 6º ano do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

*** Bióloga e auxiliar técnica do Laboratório de Neurociências do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP, Brasil.

**** Professora. Doutora na área de concentração em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado em Neurociência pela Universidade de Sheffield - Inglaterra e pela USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento-USP. Editor Chefe da Revista "Ciência, Pesquisa e Consciência", Revista do curso de Medicina das FIPA. Docente (nível I) do conteúdo de Bioquímica do curso de Medicina das FIPA, Catanduva-SP. Contato: mlrosa.fameca@gmail.com



INTRODUÇÃO

O estresse afetivo crônico, quando ocorre nos primórdios do desenvolvimento cerebral, causa alterações em diversos neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC), cujos efeitos são duradouros e se manifestam na vida adulta¹⁻⁴. Utilizando vários modelos experimentais, tem sido demonstrado que diversos tipos de manipulação animal nos primeiros dias de vida induzem uma exacerbação da resposta ao estresse. Um destes modelos é a separação materna (SM) em ratos, em que os animais recém nascidos são separados diariamente de suas progenitoras até o desmame, que ocorre no 21^o dia pós-natal (DPN21)⁵.

A utilização de modelos experimentais na pesquisa científica tem sido de grande importância no avanço de todas as áreas da medicina. Dentre elas, tem contribuído com a elucidação de processos patológicos envolvidos nas doenças neurológicas e psiquiátricas⁶. Especificamente, a exposição precoce de mamíferos a um evento estressante parece expor os mesmos a um grande risco de desenvolver doenças psiquiátricas como depressão maior e estresse pós-traumático⁷⁻¹⁰.

Uma vez que a SM pode alterar as respostas cerebrais ao estresse, é esperado que esta forma de estímulo afetivo tenha efeitos sobre diversos sistemas neurotransmissores em diferentes áreas cerebrais na vida adulta^{11,12}. De acordo com esta hipótese, evidências experimentais têm demonstrado que a neurotransmissão glutamatérgica é especificamente alterada por este estímulo, sendo de crucial importância uma vez que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, distribuído difusamente em inúmeras regiões^{5,13}.

Através da interação com receptores específicos (GluRs), o glutamato participa dos mecanismos cerebrais envolvidos tanto nas funções fisiológicas como em processos patológicos relacionados ao estresse¹⁴⁻¹⁶. Por exemplo, dentre os processos fisiológicos destaca-se a formação de redes neurais durante o desenvolvimento e as modificações plásticas envolvidas nas funções de aprendizado e memória. Entretanto, em situações de estresse para o cérebro o glutamato é altamente neurotóxico devido à excessiva ativação da neurotransmissão que leva à morte neuronal¹⁷.

Os GluRs são classificados em metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs). Os mGluRs modulam a formação de mensageiros intracelulares através do acoplamento a proteínas-G. Os iGluRs formam canais iônicos específicos e são subdivididos, de acordo com a especificidade de ligação dos agonistas, em três grupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato (KA). Os AMPA e KA são conjuntamente chamados de receptores não-NMDA¹⁸. O grupo dos receptores AMPA é composto de quatro subunidades distintas conhecidas como GluR1-4¹⁹ ou GluRA-D²⁰, codificadas por quatro genes distintos. As múltiplas combinações destas subunidades originam receptores homoméricos ou heteroméricos com diferentes propriedades funcionais^{19,20}.

Técnicas de "binding", imuno-histoquímica e hibridização *in situ* têm demonstrado que os receptores AMPA/KA estão amplamente e abundantemente distribuídos no SNC de vertebrados, embora esta distribuição não seja uniforme. Diferenças na densidade, subtipos, isoformas e combinações de subunidades são dependentes da espécie, da área cerebral, do tipo celular, do estágio de desenvolvimento cerebral etc^{16,20-26}, sugerindo características farmacológicas específicas destes receptores. Foi demonstrado que a distribuição de RNAm para as subunidades AMPA no cérebro humano é semelhante àquela encontrada no cérebro de rato e, no hipocampo humano, esta se correlaciona com a distribuição dos sítios de ligação para [³H]glutamato e [³H]AMPA^{24,27}.

Acredita-se que o conhecimento da distribuição precisa dos vários subtipos dos receptores NMDA e não-NMDA, assim como o esclarecimento do papel funcional de cada subunidade nos processos fisiológicos e patológicos, auxiliariam na identificação de alvos terapêuticos específicos e no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das anormalidades cerebrais que podem ser causadas pelo funcionamento inadequado dos GluRs.

A mediação glutamatérgica, através dos receptores NMDA e não-NMDA, tem sido demonstrada participar especificamente dos mecanismos hipocampais de resposta ao estresse afetivo por SM, assim como nas

desordens mentais decorrentes, tais como o estresse pós-traumático e a depressão maior^{2,5,14}. Um único episódio de SM induziu uma redução nas subunidades dos receptores NMDA hipocampais²⁸. Posteriormente, Pickering e colaboradores⁵ utilizando RT-PCR demonstraram que a SM (DPN1-21) induz uma redução na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 em todo o hipocampo. Com o objetivo de estender o conhecimento das alterações induzidas pela SM na expressão destas subunidades nas áreas específicas do hipocampo, neste estudo analisamos a expressão de GluR1 e GluR2 nas áreas CA1, CA3, hilus do giro denteado de animais submetidos ao estresse por SM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Condições de criação

Ratos *Wistar* machos, no dia do nascimento (DPN 0), foram separados das progenitoras e notificados de acordo com o sexo. Com a finalidade de evitar as possíveis influências das variações hormonais, as fêmeas foram descartadas e os filhotes machos foram aleatoriamente agrupados com uma rata progenitora (6/mãe) em uma caixa plástica (48,5 x 25,8 x 15,6-cm), forrada com maravalha e com aporte constante de água e ração. Nestas condições os animais foram transportados do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) – campus Ribeirão Preto para o biotério das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP, onde foram alojados em sala climatizada (21^o±2^o) com ciclo claro/escuro de 12 horas (7h-19h).

Separação Materna (SM)

A SM foi realizada de acordo com Pickering e colaboradores⁵. No DPN 01 os animais foram divididos em uma das duas condições: 1) Separação Materna (SM) - os filhotes (n=10) foram separados das progenitoras por 3 horas diariamente, no período claro do dia (09h30min às 12h30min) e 2) Não separados (NS) - os animais (n=11) foram mantidos com suas progenitoras durante todo o período experimental.

No dia do desmame (DPN 21), as progenitoras foram sacrificadas e os filhotes mantidos em grupos randomizados, quatro ratos/caixa, onde permaneceram por cinco semanas.

Os experimentos ocorreram de acordo com as normas da sociedade brasileira de neurociência e comportamento para cuidados com animais de laboratório e todas as condutas foram devidamente tomadas para minimizar o sofrimento dos animais.

Imuno-histoquímica

Os animais foram profundamente anestesiados (uretana, 25%, Sigma) e sacrificados para a realização da perfusão intra cardíaca com PBS 0,1M, pH7,4 (PBS), seguida por PBS 0,1M pH7,4 + PFA4% em PBS. Os cérebros foram imediatamente removidos e imersos na solução de PFA4% por 2 horas adicionais e, em seguida, os mesmos foram crioprotetidos em solução de sacarose 30% em PBS por 48 horas (4°C). Após estes procedimentos, os cérebros foram congelados em isopentana (-40°C, Sigma) e estocados a -70°C até o seccionamento. Vinte e quatro horas antes deste procedimento os cérebros foram transferidos para um freezer a -20°C. As áreas cerebrais foram selecionadas utilizando como referência o atlas ilustrado de projeções estereotaxicas de Paxinos e Watson (1997). Em seguida, secções coronais (40µm) contendo hipocampo foram obtidas no criostato (-20°C, Leica) e processados para imuno-histoquímica. Os tecidos foram sucessivamente lavados e incubados (18horas) com o anticorpo primário anti-GluR1 (1:500, Chemicon) ou anti-GluR2 (1:500, Millipore). Após este período foram novamente lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado (1:250, Dako) por 90 minutos e, em seguida, incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC, kit Vector). As células imunorreativas para GluR1 ou GluR2 foram reveladas pela adição do cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) e hidrogênio peroxidase. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e cobertas com permount e lamínula para análise microscópica. Neurônios imunopositivos para GluR1 e GluR2 puderam ser visualizados e quantificados pela coloração marrom-caramelo.

Quantificação e análise

As secções cerebrais contendo hipocampo (hilus do giro denteado, CA3 e CA1) foram analisadas e as

imagens capturadas utilizando microscópio óptico (Axioskop 40 with AxioCam ICc3, Zeiss) para posterior quantificação através do programa de análise de imagens (AxioVision Release 4.6.3, 04-2007, Zeiss).

A quantificação de células imunopositivas para GluR1 e GluR2 foi realizada em todo o campo de visão de magnitude 200x (i.e. 10x eyepiece e 20x objetiva plana), considerando uma área fixa de 566 x 424µm (0,24mm²) para cada região cerebral. Cada campo foi quantificado em três secções por animal, bilateralmente (seis valores/região/rato), por dois observadores independentes. Os resultados foram expressos em número de células imunopositivas para GluR1 e GluR2/ 0,1mm². Devido ao grande número de células imunopositivas para GluR2 na área CA1 hipocampal, a expressão de GluR2 foi medida por densitometria. As imagens coloridas relativas a estas áreas foram capturadas e convertidas em preto e branco para a medida de densidade óptica (DO) em "escala de cinza" utilizando o *software* "Image J". O valor original (DO para cada área subtraída pela DO do plano de fundo do tecido) foi subtraído do valor máximo de brilho (255) e convertido em escala logarítmica (DO corrigida), com o objetivo de obter um valor numérico que aumenta proporcionalmente com o aumento do sinal²⁹⁻³¹. A DO foi também medida bilateralmente, em três secções/animal e a leitura utilizada para calcular a média do número de células imunopositivas para GluR2 de cada animal.

Os resultados obtidos para os grupos SM e NS foram comparados pelo teste "t" de *Student*, utilizando o *software* SPSS e as diferenças consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Expressão das proteínas GluR1 no hipocampo

Observamos que a expressão de GluR1 e GluR2 no hipocampo foi heterogênea, demonstrada pelas diferenças no número de células imunopositivas para estas subunidades nas diversas áreas hipocampais. Para a proteína GluR1 nenhuma alteração foi observada no hilus do giro denteado quando o grupo SM foi comparado ao grupo NS. Entretanto, a SM induziu uma redução de 12% na área CA3, próximo ao nível de significância ($t=1,99$; $p=0,065$) (Figura 1 e Figura 2A, B, C, D).

A Figura 2 (E, F) mostra secções cerebrais nas quais os anticorpos primários, anti-GluR1 e anti-GluR2 foram omitidos no procedimento de imuno-histoquímica. A completa ausência de marcação comprova a especificidade de ligação.

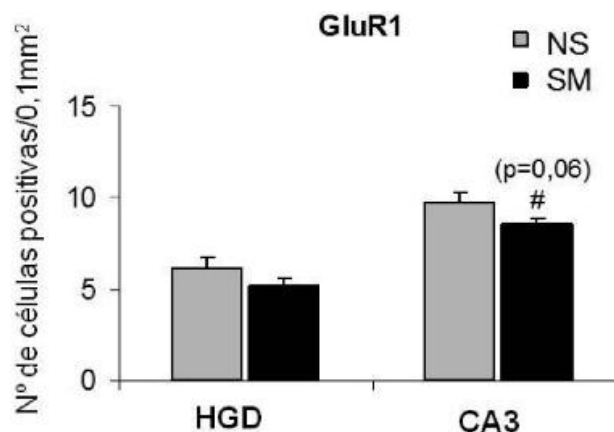


Figura 1- Efeito da separação materna na expressão de GluR1 nas áreas hipocampais (HGD e CA3). Os valores representam a Média ± EPM. * $p < 0,05$ (teste *t-Student*)

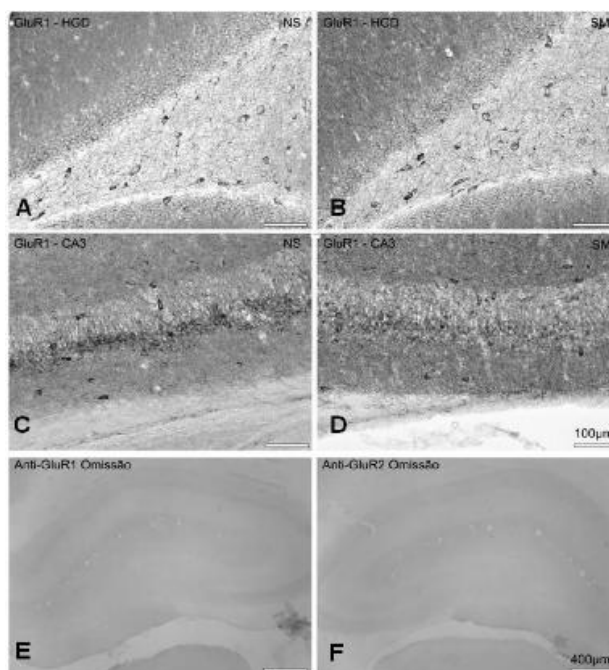


Figura 2 - Imuno-histoquímica para os receptores AMPA do tipo GluR1 no hipocampo de ratos. GluR1 (HGD, A e B; CA3, C e D). Secções incubadas com o Ac primário anti-GluR1, Chemicon (1:500) e com o Ac secundário, Dako. Barra = 100µm. Secções incubadas na ausência do Ac primário. Barra = 100µm e 400µm (E e F)

Expressão das proteínas GluR2 no hipocampo

Para a proteína GluR2 um aumento significativo de 36% ($t=4,00$; $p=0,001$) foi encontrado no hilus do

giro denteado, em contraste com uma redução significativa de 24% ($t=4,00$, $p=0,001$) na área CA3 dos animais SM em relação aos NS (Figura 3A e Figura 4A, B, G, H). Na área CA1 a expressão de GluR2 foi quantificada por DO e observamos um aumento de 27% ($t= -1,96$; $p=0,018$) no grupo SM em relação aos NS (Figura 3B e Figura 4E, F).

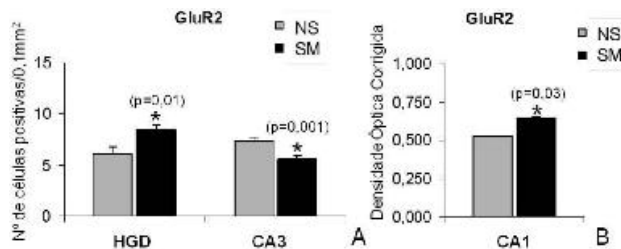


Figura 3- Efeito da separação materna na expressão de GluR2 nas áreas hipocâmpais (HGD, CA3 e CA1). Os valores representam a Média ± EPM. * $p<0,05$ (teste *t-Student*)

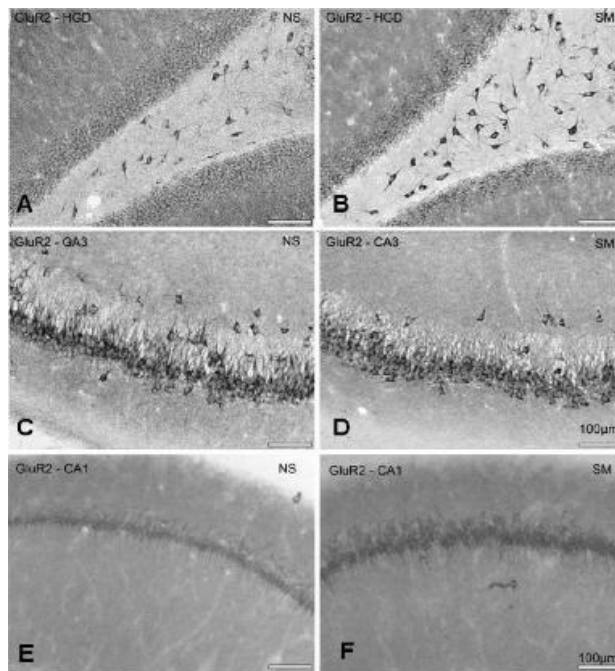


Figura 4 - Imuno-histoquímica para os receptores AMPA do tipo GluR2 no hipocampo de ratos. GluR2 (HGD, A e B; CA3, C e D; CA1, E e F). Seções incubadas com o Ac primário anti-GluR2, Invitrogen (1:50) e com o Ac secundário, Dako. Barra = 100µm.

DISCUSSÃO

As desordens mentais que se expressam muitas vezes somente na vida adulta podem ser decorrentes de alterações extremamente precoces, iniciadas no período neonatal quando ocorre o desenvolvimento cerebral^{3,4}. A Separação Materna é um modelo animal de estresse afetivo crônico, aplicado no início da vida e

amplamente utilizado em estudos que avaliam os efeitos de drogas anti-depressivas^{3,6,9,10}. O estresse crônico aplicado durante o momento crítico do desenvolvimento cerebral promove alterações em vários neurotransmissores do SNC^{5,22,28}.

O estímulo estressante promove, de imediato, um aumento nos níveis de cortisol na corrente sanguínea, que é centralmente percebido no córtex entorrinal. A partir desta região, uma via glutamatérgica excitatória emerge para o HGD (via perfurante), o qual estabelece conexão sináptica também glutamatérgica com a área CA1, que novamente faz conexão com a área CA3 e córtex envolvendo também o neurotransmissor glutamato. O conjunto destas vias é chamado de "loop glutamatérgico" de resposta ao estresse. A partir do hipocampo são estabelecidas conexões excitatórias para outras regiões da formação hipocâmpal as quais são também estimuladas em resposta ao estresse. Devido à grande importância da mediação glutamatérgica nestas respostas, é fundamental o esclarecimento da composição dos receptores de glutamato presentes nestas áreas cerebrais envolvidas.

Nossos resultados mostram a distribuição regional dos receptores de glutamato do tipo AMPA, sub-unidades GluR1 e GluR2, no hipocampo de ratos submetidos ao estresse por SM. É classicamente conhecido que as propriedades do canal iônico destes receptores são dependentes da composição de suas subunidades. Receptores AMPA compostos apenas de GluR2 são impermeáveis ao Ca^{++} , enquanto receptores compostos de GluR1, GluR3 ou GluR4 são altamente permeáveis ao Ca^{++} . Receptores AMPA co-expressando GluR2 com GluR1, GluR3 e/ou GluR4 apresentam pouca permeabilidade ao Ca^{++} ^{18,32,33}. A redução de GluR1 encontrada para as áreas CA3 nos animais submetidos à SM sugerem uma redução na excitabilidade da via glutamatérgica envolvida na estimulação cerebral disparada pelo córtex entorrinal (Cx.E) em resposta ao estresse.

No cérebro adulto, a elevada expressão de GluR2 na composição do receptor AMPA limita o influxo de Ca^{++} para dentro dos neurônios centrais, modulando sua atividade funcional. Entretanto, nos cérebros embrionários

a baixa expressão de GluR2 leva ao predomínio das subunidades permeáveis ao Ca^{++} na composição do receptor, demonstrando que ocorre maior excitabilidade durante o desenvolvimento cerebral¹⁷. Em nosso estudo, o aumento encontrado para a subunidade GluR2 no HGD e CA1, as primeiras áreas estimuladas pelo Cx.E em resposta ao estresse, reforçam a queda de excitabilidade nestas vias, altamente recrutadas durante o período de estresse crônico por SM.

A ativação de receptores específicos (NMDA, AMPA ou KA) leva a alterações na homeostase ao Ca^{++} , que induz aumento na concentração de espécies de oxigênio reativos (ROS), e conseqüentemente, morte celular³⁴. No intuito de preservar os neurônios envolvidos na resposta ao estresse, tanto a redução de GluR1 como o aumento de GluR2 encontrado em nosso estudo mostram uma modulação negativa da excitabilidade glutamatérgica mediada por AMPA em todo hipocampo dos animais separados. Se por um lado nossos resultados sugerem que a SM dispara um mecanismo de plasticidade

neural ao modular uma via previamente hiperestimulada, por outro estes resultados podem representar um dos mecanismos responsáveis por desencadear processos patológicos tais como a depressão maior e o estresse pós-traumático, que virão a se manifestar na vida adulta.

CONCLUSÕES

Os modelos animais são importantes ferramentas para o estudo e compreensão da fisiopatologia de diversas desordens mentais. O estresse afetivo crônico provocado pela separação materna em ratos é capaz de induzir alterações permanentes em receptores AMPA do glutamato nas diferentes áreas hipocâmpais. Tais alterações resultam na modulação negativa das vias glutamatérgicas, que podem representar uma forma de neuroplasticidade ou o início de um processo patológico.

O conhecimento específico do envolvimento da mediação glutamatérgica na patogênese das doenças mentais pode abrir o caminho para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e efetivos no tratamento destas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Ammerman R, Cassisi J, Hersen M, Hasselt VV. Consequences of physical abuse and neglect in children. *Clin Psychol Rev.* 1986; 6:291-310.
2. Heim C, Plotsky PM, Nemeroff CB. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29:641-8.
3. Sanchez M, Ladd C, Plotsky P. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol.* 2001; 13:419-9.
4. Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry.* 2000; 48:778-90.
5. Pickering C, Gustafsson L, Cebere A, Nylander I, Liljequist S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Research.* 2006; 1099:101-8.
6. Kim JW, Kirkpatrick B. Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry.* 1996; 40:918-22.
7. Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Inglis W, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59:859-72.
8. Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ & Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res.* 2000; 122:81-103.
9. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry.* 2001; 49:1023-39.
10. Arborelius L, Hawks BW, Owens MJ, Plotsky PM & Nemeroff CB. Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology (Berl.).* 2004; 176:248-55.
11. Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry.* 2004; 55:367-75.
12. Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003; 27:57-71.
13. Herlenius E, Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol.* 2004; 190(Suppl. 1):S8-S21.
14. Fontella FU, Vendite DA, Tabajara AS, Porciuncula LO, da Silva Torres IL, Jardim FM, Martini L, Souza DO, Netto CA, Dalmaz C. Repeated restraint stress alters hippocampal glutamate uptake and release in the rat. *Neurochem Res.* 2004; 29:1703-9.
15. Lowy MT, Gault L, Yamamoto, BK. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem.* 1993; 61:1957-60.
16. Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 1993; 60:1650-7.
17. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiology.* 1998; 54:581-618.
18. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17:31-108.
19. Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science.* 1990 Aug 31;249(4972):1033-7.
20. Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn T A, Sakmann B, Seeburg PH. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science.* 1990; 249:556-60.
21. Sommer B, Keinänen K, Verdoorn T A, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Köhler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg P H. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science.* 1990; 249:1580-5.
22. Monyer H, Seeburg PH, Wisden W. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron.* 1991 May; 6(5):799-810.

23. Wisden W, Seeburg PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Jun; 3(3):291-8.
24. Garcia-Ladona FJ, Palacios JM, Probst A, Wieser HG, Mengod G. Excitatory amino acid AMPA receptor mRNA localization in several regions of normal and neurological disease affected human brain. An in situ hybridization histochemistry study. *Mol Brain Res.* 1994; 21:75-84.
25. Porter RH, Eastwood SL, Harrison PJ. Distribution of kainate receptor subunit mRNAs in human hippocampus, neocortex and cerebellum, and bilateral reduction of hippocampal GluR6 and KA2 transcripts in schizophrenia. *Brain Res.* 1997; 751:217-31.
26. Sestito RS, Trindade LB, de Souza RG, Kerbauy LN, Iyomasa MM, Rosa ML. Effect of isolation rearing on the expression of AMPA glutamate receptors in the hippocampal formation. *J Psychopharmacol.* 2010 Oct 15; 0(0):1-10.
27. Jansen KL, Dragunow M, Faull RL. [3H]glycine binding sites, NMDA and PCP receptors have similar distributions in the human hippocampus: an autoradiographic study. *Brain Res.* 1989 Mar 13; 482(1):174-8.
28. Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry.* 2002; 7:609-16.
29. de Oliveira RM, Del Bel EA, Mamede-Rosa ML, Padovan CM, Deakin JF, Guimarães FS. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci Lett.* 2000; 289:123-6.
30. Rosa ML, Guimarães FS, Pearson RCA, Del Bel EA. Effects of single or repeated restraint stress on GluR1 and GluR2 flip and flop mRNA expression in the hippocampal formation. *Brain Res Bull.* 2002; 59:117-24.
31. Palha JA, Nissanov J, Fernandes R, Sousa JC, Bertrand L, Dratman MB, Morreale de Escobar G, Gottesman M, Saraiva MJ. Thyroid hormone distribution in the mouse brain: The role of transthyretin. *Neuroscience.* 2002; 113:837-47.
32. Seeburg PH. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 1993 Sep; 16(9):359-65.
33. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg P H, Monyer H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate channels in neocortical neurons caused by differential gluR-B subunit expression. *Neuron.* 1994; 12:1281-9.
34. Hampson RE, Rogers G, Lynch G, Deadwyler SA. Facilitative effects of the ampakine CX516 on short-term memory in rats: correlations with hippocampal neuronal activity. *J Neurosci.* 1998 Apr 1; 18(7):2748-63.

IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DO DISCO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DO GLAUCOMA

IMPORTANCE OF THE ANALYSIS OF OPTICAL DISC FOR EARLY DIAGNOSIS OF GLAUCOMA

Maria Elizabete Jimenes de Campos*

RESUMO

O glaucoma é a maior causa de cegueira não curável no mundo. No Brasil a forma predominante da doença é o Glaucoma Primário de Ângulo Aberto que, pelas suas características, não é passível de detecção antes que ocorram alterações da cabeça do nervo óptico e/ou da camada de fibras nervosas da retina. Mesmo em áreas bem desenvolvidas socioeconomicamente, cerca de 50% dos casos de glaucoma não são diagnosticados ou o são tardiamente, já com grande perda visual. Considerando as dificuldades dos rastreamentos populacionais para glaucoma, cabe ressaltar a importância do exame cuidadoso do disco óptico pelo oftalmologista em todos os pacientes.

Palavras-chave: Glaucoma. Disco óptico. Exame físico.

ABSTRACT

Glaucoma is the leading cause of blindness in the world not curable. In Brazil the predominant form of the disease is primary open-angle glaucoma which, by their nature, is not capable of detecting changes that occur before the optic nerve head and / or nerve fiber layer of the retina. Even in a well-developed socio-economically, about 50% of glaucoma cases are not diagnosed or are late, already with great visual loss. Considering the difficulties of population screening for glaucoma, it is worth emphasizing the importance of careful examination of the optic disc by the ophthalmologist in all patients.

Keywords: Glaucoma. Optic disk. Physical examination.

* Médica Oftalmologista e Docente do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA). Contato: siscor@uol.com.br

INTRODUÇÃO

O glaucoma é a maior causa de cegueira não curável no mundo¹ e sua evolução é lenta, gradual e assintomática, sendo que a maioria dos diagnósticos é realizada quando a doença já está em estágio avançado². Em 2003, o Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimava que no Brasil houvesse 900 mil portadores dessa doença³. Portanto, é evidente a necessidade de diagnóstico precoce.

É consenso que no Brasil a forma predominante da doença é o Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) que, pelas suas características, não é passível de detecção antes que ocorram alterações da cabeça do nervo óptico e/ou da camada de fibras nervosas da retina. No entanto, por meio desses sinais, pode-se fazer a suspeita de glaucoma, antes que ocorram perdas do campo visual.

Por isso, é preconizado que os rastreamentos de glaucoma pré-perimétrico em populações ou na prática clínica iniciem com o exame da cabeça do nervo óptico⁴⁻⁸. Mesmo com a utilização de oftalmoscopia direta, em olhos com pigmentação normal, é possível verificar, também, lesões na camada de fibras nervosas que podem preceder as do nervo óptico e, geralmente, aparecem vários anos antes das perdas no campo visual. Portanto, há diferença entre a progressão estrutural (nervo óptico e camada de fibras nervosas) e a progressão funcional (campo visual) do glaucoma⁹⁻¹¹.

No Brasil, ainda permanece a dificuldade de submeter a população, em geral, aos exames necessários para o diagnóstico do glaucoma.

Mesmo em áreas bem desenvolvidas socioeconomicamente, cerca de 50% dos casos de glaucoma não são diagnosticados ou o são tardiamente, já com grande perda visual.

Além disso, parcela significativa da população não segue corretamente as recomendações médicas ou o uso das medicações prescritas^{12,13}.

Várias campanhas de âmbito nacional já foram realizadas para detecção precoce da doença, porém acontecem quase sempre nos grandes centros com acesso limitado. Além disso, a maioria dessas campanhas utiliza somente a tonometria, que não é o exame inicial

adequado para o rastreamento do glaucoma. Desta forma, a maioria das campanhas tem apenas a função de educar a população sobre o glaucoma.

O exame fundoscópico direto do disco óptico, por si só, não é suficiente para o referido diagnóstico, porém é o primeiro alerta num exame de rotina em que há suspeita da doença, devendo-se iniciar a investigação. Estudos específicos e outros métodos de diagnóstico do glaucoma deveriam ser realizados em todos os casos suspeitos, bem como um acompanhamento periódico desses pacientes⁵.

Estudo realizado na FMRP-USP para detectar a eficácia de métodos diagnósticos no rastreamento do glaucoma concluiu que a probabilidade de um indivíduo selecionado apenas pelo aumento da escavação do nervo óptico apresentar defeito no campo visual é de 34,8%. A associação do exame supralimiar com o exame do disco óptico aumentou a probabilidade de haver alterações na campimetria de estímulos liminares de 34,8% para 85% se o primeiro for positivo (alterado) e diminuiu para 12% se este for negativo (normal). Quando o exame do disco é associado à tonometria, a probabilidade inicial aumenta de 34,8% apenas para 50% se o teste for positivo (PO>20 mmHg) e diminuiu para 32% se o teste for negativo (PO<20mmHg)¹⁴.

A avaliação das imagens fotográficas do disco óptico tem sido historicamente recomendada tanto para o diagnóstico quanto para a detecção de progressão da doença⁷.

As escavações fisiológicas variam de um indivíduo para outro, dependendo da dimensão do canal da esclerótica. Na maioria dos indivíduos existe simetria, entre os olhos, da relação escavação/disco, sendo assimetria importante sinal na suspeita de lesão glaucomatosa. Diferenças de razão escavação/disco de 0,2 podem aparecer em 1 a 6% da população adulta normal e assimetrias de 0,3 em 1% da população geral¹⁵⁻¹⁸.

Salienta-se que, no glaucoma juvenil, o aspecto da papila óptica é, muitas vezes, mais importante que a aferição da PIO^{19,20}.

Considerando as dificuldades dos rastreamentos populacionais para glaucoma, cabe ressaltar a importância do exame do disco óptico pelo oftalmologista, no momento de consultas de rotina.

REFERÊNCIAS

1. Foster A, Gilbert C, Johnson G. Changing patterns in global blindness: 1988-2009. *Community Eye Health*. 2008; 21:37-9.
2. Sheldrick JH, Sharp AJ. Glaucoma screening clinic in general practice: prevalence of occult disease, and resource implications. *Br J Gen Pract*. 1994; 44(389):561-5.
3. Mello PAA, Melo Júnior LAS. Glaucoma dos nossos dias: revendo conceitos e custos. *Rev Bras Oftalmol*. 2003; 62(9):669-77.
4. Congdon N, Wang F, Tielsch J. Issues in the epidemiology and population-based screening of primary angle-closure glaucoma. *Surv. Ophthalmol*. 1992; 36:411-23.
5. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86:238-42.
6. Sociedade Brasileira de Glaucoma (SBG). Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo; 2005.
7. Lin SC, Kuldev S, Jampel HD, Hodapp EA, Smith SD, Francis BA, Dueker DK, Fechtner RD, Samples JS, Schuman JS, Minckler DS. Optic nerve head and retinal nerve fiber layer analysis. *Ophthalmology*. 2007; 114:1937-49.
8. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkaken R, Nemesure B. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology*. 2008; 115:85-93.
9. Sun F, Zhang X, Bian X. Na ultrastructural study on human retina with late glaucoma. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih*. 1996; 32:35-7.
10. Rouland JF. Les pièges de l'examen de La papille optique (ou conduite à tenir devant une excavation papillaire). *J Fr. Ophtalmol*. 1999; 22(1):94-6.
11. Chauman BC. Comparison of structural and functional methods II. In: Weinreb RN, Greve EL, editors. *Glaucoma diagnosis, structure and function*. The Hagu: Kugler Publications; 2004. p. 15-8.
12. Medina NH, Barros DE, Munhães EH, Magdaleno RL, Barros AJA, Dornellas J de, et al. Morbidade ocular em idosos da cidade de São Paulo SP, Brasil. *Arq Bras Oftalmol*. 1993; 56:273-83.
13. Póvoa CA, Nicotela MT, Valle AL, Gomes LE, Neustein I. Prevalência de glaucoma identificada em campanha de detecção em São Paulo. *Arq Bras Oftalmol*. 2001; 64(4):303-7.
14. Costa RMS, Velasco TR, Costa LS, Rodrigues MLV. Eficácia da associação de métodos diagnósticos no rastreamento do glaucoma. *Arq Bras Ottalmol*. 2004; 64:37-41.
15. Susanna Jr. R, Medeiros FA. Nervo óptico no glaucoma. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2004. p. 3-14.
16. Allingham RR, Shields B, Damji KF, Freedman S, Moroi SE, Shafranov G. *Shield's Textbook of Glaucoma*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2005. p. 170-96.
17. Boland MV, Quigley HA. Risk factors and open-angle glaucoma: classification and application. *J Glaucoma*. 2007;16(4):406-18.
18. Bron A, Chaine G, Villain M, Colin J, Nordmann JP, Renard JP, Rouland JF. Risk factors for primary open-angle glaucoma. *J Fr Ophtalmol*. 2008; 31(4):435-44.
19. Shields MB. *Glaucoma*. 2ª ed. São Paulo: Panamericana; 1989.
20. Hitchings RA. *Atlas de clínica oftalmológica*. São Paulo: Manole; 1992.

COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS EM PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

INFECTIOUS COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Renato Eugênio Macchione*, Fábio Macchione dos Santos*, Pedro Enzo Macchione*, Marcelo Ceneviva Macchione*

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica tem merecido grande interesse e preocupação da comunidade médica e científica por seu comportamento epidemiológico de crescente prevalência e mortalidade. A infecção respiratória constitui a principal causa de agudização, conhecida como episódio de exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica, com piora aguda na função pulmonar e um rápido aumento na frequência de sintomas respiratórios, com prejuízo a qualidade de vida e restrição da autonomia dos pacientes.

Palavras-chave: Doença pulmonar obstrutiva crônica. Infecção. Diagnóstico.

ABSTRACT

The respiratory disease known as chronic obstructive pulmonary disease has aroused great interest and concern in the medical and scientific community due to an epidemiological trend toward an increase in this prevalence and mortality. The respiratory infection is the great cause of acute worsening, known as episodes of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation, that consists of acute deterioration in pulmonary function and a fast increase in the frequency of respiratory symptoms, negatively affecting the quality of life of patients and limiting their autonomy.

Keywords: Pulmonary disease chronic obstructive. Infection. Diagnosis.

Artigo de Revisão



CONCEITO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como uma patologia evitável, pois cerca de 90% das pessoas que a têm são fumantes, por isso basta, principalmente, evitar a exposição ao tabaco. A doença caracteriza-se pela limitação crônica ao fluxo aéreo, ser parcialmente reversível e geralmente progressiva; considerada de origem inflamatória e, conseqüentemente, tratável. Não é incomum a associação entre DPOC e outras comorbidades, como a doença cardiovascular, caquexia, osteoporose, neoplasia, diabetes e hipertensão arterial sistêmica, cujos fenótipos terão diferentes manifestações clínicas na história natural da patologia. É a maior causa de morbimortalidade entre as doenças crônicas, no Brasil; o projeto Platino (Projeto Latino-Americano de Investigação em Obstrução Pulmonar) estimou a prevalência em 6% a 15,8% da população com idade igual ou superior a 40 anos. Na América Latina, a prevalência flutuou entre 7,8% no México a 19,7% no Uruguai, cuja prevalência mundial, calculada de 7% a 10% da população, compromete a qualidade de vida dos pacientes de forma acentuada¹.

O diagnóstico clínico deve ser suspeitado nos casos de pacientes com idade acima de 40 anos, com história crônica de tosse, expectoração e/ou dispneia aos esforços, na presença de história de exposição a fatores de risco, cujo mais importante é o tabagismo. A deficiência sérica de alfa-1 antitripsina sérica também é uma causa de enfisema e, entretanto, só ocorre em torno de 1% dos pacientes com DPOC. Dentre os objetivos de controle clínico dos portadores de DPOC, destacam-se quatro componentes: avaliar e monitorar a doença, reduzir os fatores de risco, manter a estabilidade e controlar as exacerbações. O controle inadequado das exacerbações leva a persistência de inflamação nas vias aéreas e a perda acelerada de função pulmonar, caracterizada clinicamente pelo aparecimento ou piora da dispneia e/ou de tosse e/ou volume de expectoração, que habitualmente apresenta alteração da sua coloração (amarelada ou esverdeada) ou viscosidade. Portanto, o quadro clínico presuntivo tem como base a piora do *status* respiratório anterior do paciente².

ETIOLOGIA

A principal causa de exacerbação da DPOC são as infecções das vias aéreas inferiores, responsável pelo quadro clínico agudo, episódico, cujas conseqüências são o aumento da inflamação brônquica e sistêmica, além da piora clínica do paciente.

Dentre os agentes bacterianos, destacam-se o *H. influenzae* não-encapsulado, o *S. pneumoniae* e a *M. catarrhalis* como organismos cuja colonização das vias respiratórias superiores e inferiores são frequentes nesses pacientes. Dentre estes, o *H. influenzae* é considerado o principal agente etiológico nas exacerbações agudas (20% a 30%), enquanto o *S. pneumoniae*, de 10% a 15%, inversamente aos descritos nos casos de pneumonia. Nos pacientes com estágio mais avançado, no entanto, aumenta a presença de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *enterobacteriaceas*. A colonização da árvore traqueobrônquica é, por si só, problema significativo para a DPOC, tanto em relação à cronicidade, como à gravidade. Assim, o resultado de sucessivas infecções poderá desencadear o desenvolvimento de fibrose e deformidades na árvore brônquica (Bronquiectasias). Nos casos mais graves, a colonização por *Pneumocystis jiroveci* tornou-se prevalente, além da infecção pela *pseudomonas*, como fator causal da exacerbação respiratória aguda nos usuários crônicos de corticosteróides e doença pulmonar avançada. A colonização das vias aéreas inferiores pelos fungos ocorrem com determinada frequência neste último grupo³.

PATOGÊNESE

A compreensão da patogenia das doenças pulmonares obstrutivas crônicas era limitada às observações histológicas e fisiológicas relacionadas aos fatores de risco como o tabagismo. É necessário considerar, também, outros fatores em sua gênese, como a poluição ambiental, fatores ocupacionais e genéticos. Além disso, o entendimento da patogênese tem aumentado substancialmente com o uso de técnicas moleculares, imunológicas e celulares no estudo da interação hospedeiro-patógeno, na demonstração da infecção como causa predominante de exacerbação

aguda e na importância do componente inflamatório da doença.

A proliferação bacteriana na árvore brônquica desencadeia série complexa de eventos como o recrutamento celular, incluindo os neutrófilos, associado à transudação protéica do plasma e à ativação e liberação enzimática. O círculo vicioso descrito é suficiente para a progressiva piora da DPOC a partir da colonização bacteriana (infecção crônica) em qualquer estágio da doença. A limitação crônica ao fluxo aéreo, em decorrência da obstrução das vias, faz com que ocorra retenção anormal de ar, aprisionado nos pulmões. Em decorrência desta anormalidade mecânica, surgem os sinais e sintomas característicos como a dispneia e limitação das atividades, o que favorece a falta de condicionamento dos pacientes⁴.

QUADRO CLÍNICO

Durante a evolução da moléstia, além da piora progressiva, os pacientes evoluem com exacerbações agudas, importante fator de morbimortalidade, cujo predomínio afeta os fumantes e ex-fumantes de ambos os sexos, principalmente acima dos 50 anos de idade. Por definição estabelecida pelo *Global Initiative for Obstructive Lung Disease* (GOLD), tratam-se de doenças caracterizadas por limitação crônica ao fluxo aéreo parcialmente reversível aos broncodilatadores, geralmente progressivas e associadas à resposta inflamatória dos pulmões aos estímulos.

Na exacerbação aguda do paciente com DPOC por infecção, destaca-se a mudança da coloração e o aumento da expectoração, surgimento ou piora da dispneia, além de outros sintomas inespecíficos como anorexia, mal-estar geral e, ocasionalmente, febre. O exame físico é variável, dependendo do grau de comprometimento basal do sistema respiratório, podendo ser normal ou, no outro extremo, apresentar sinais de franca insuficiência respiratória, tais como, dispneia importante, cianose, agitação, confusão mental e piora das comorbidades de base⁵. A piora do estado clínico e funcional dos pacientes determina aumento do trabalho da musculatura torácica e falência respiratória, com

necessidade de internação hospitalar e, em alguns casos, a instituição de suporte ventilatório máscara de pressão positiva, ou de modo invasivo na unidade de cuidados intensivos.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das exacerbações infecciosas na DPOC é, basicamente, clínico, com base no exame de espirometria realizado previamente, utilizado na confirmação do diagnóstico e na avaliação da gravidade da obstrução ao fluxo aéreo. No entanto, só 12% dos pacientes já fizeram uma espirometria alguma vez na vida, segundo o projeto Platino. A radiografia de tórax revela, na maioria dos casos, hiperinsuflação pulmonar ou acentuação de imagens lineares e, com frequência, não permite a caracterização do processo infeccioso. Há utilização cada vez maior da tomografia de tórax, cujo resultado do exame pode demonstrar a presença de bronquiectasias localizadas, comuns em casos avançados da DPOC. O hemograma geralmente não apresenta qualquer alteração sugestiva de infecção bacteriana, mesmo na ocorrência da mesma. A gasometria arterial auxilia na determinação da gravidade do comprometimento funcional, especialmente quando a hipercapnia estiver presente no quadro agudo. Os principais diagnósticos diferenciais são: asma, bronquiectasia, tuberculose, aspergilose, pneumotórax, tromboembolia, cardiopatia, histoplasmose, bronquiolite, pneumopatia intersticial, traqueobroncomalácia, aspiração digestiva recorrente, doença auto-imune, neoplasia, mucoviscidose do adulto, discinesia ciliar e demais pneumopatias nos indivíduos portadores de imunodeficiência adquirida⁶.

TRATAMENTO

Os pacientes com exacerbação aguda da DPOC são divididos em dois grupos em relação à escolha dos antibióticos: grupo não complicado e grupo complicado.

O grupo não complicado inclui os pacientes abaixo de 65 anos de idade, sem fatores de risco, outras doenças associadas significativas (cardiopatias), com menos de três exacerbações durante o ano anterior, sem uso frequente de corticosteróide e prova de função

pulmonar anual (espirometria) com VEF1 maior que 50%. Caso a deterioração clínica destes pacientes seja leve, devido ao quadro clínico não complicado, é preconizado o controle do sintoma principal (exemplo-piora da dispneia) com observação nas primeiras 72 horas. Entretanto, nas exacerbações agudas moderadas e graves, com piora do *status* clínico, com aparecimento de dois ou três sintomas principais (aumento da dispneia e/ou volume e/ou coloração esverdeada da secreção), a escolha do antibiótico é feita a partir dos grupos relacionados, sem ordem de preferência: amoxicilina, azitromicina, claritromicina, doxiciclina, cefuroxime, sulfametoxazol-trimetopim. Caso tenha sido utilizado recentemente algum antibiótico (prazo inferior a três meses), é escolhida uma outra classe no tratamento subsequente⁷.

No grupo complicado estão os pacientes com DPOC acima de 65 anos de idade, um ou mais fatores de risco, portadores de comorbidades graves (cardiopatias), mais de três exacerbações durante o ano anterior, uso frequente de corticosteróides e VEF1 menor que 50%. Portanto, inclui pacientes com maior risco de deterioração. Neste grupo é sugerida a introdução de antibióticos com maior ação bactericida. Devem ser administrados: moxifloxacina, gemifloxacina, levofloxacina, amoxicilina-clavulanato. Caso tenha o risco de infecção pelas *pseudomonas*, considerar a utilização de ciprofloxacina e solicitar investigação bacteriológica com cultura. Da mesma maneira, caso tenha sido utilizada uma classe de antibióticos nos últimos três meses, considere o emprego de outra classe.

Como regra geral, o emprego dos antibióticos, como a tetraciclina, ampicilina ou sulfametoxazol-trimetoprim são considerados pouco eficazes no tratamento das infecções pelo *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, principais responsáveis pela exacerbação aguda da DPOC. A azitromicina não é superior à amoxicilina ou amoxicilina-clavulanato como tratamento empírico da exacerbação aguda de DPOC, entretanto, recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado crescente utilização nestas situações clínicas⁸.

É de fundamental importância o abandono do vício de fumar, mesmo em fases adiantadas da doença,

assim como evitar exposições ocupacionais/ambientais agressoras. Estas orientações podem reduzir a perda acelerada da função pulmonar. Os benefícios são muitos e os principais sintomas, como a redução na produção de secreção e da tosse, ocorrem após a interrupção do tabagismo. Em todas as consultas o tema deverá ser abordado e estabelecido um plano de ação contra a exposição ao tabaco ativo e passivo.

Outras medidas devem ser introduzidas no tratamento para reduzir a limitação ao fluxo de ar através do uso dos broncodilatadores com ação beta-2 adrenérgica por via inalatória (de curta ação como o fenoterol e o salbutamol, ou de longa duração como o salmeterol ou o formoterol), drogas anticolinérgicas (brometo de ipratrópio, tiotrópio), isoladamente ou associadas aos beta-2. O papel das teofilinas, no tratamento da DPOC, suscita controvérsias em relação ao seu efeito broncodilatador, mas melhora a função da musculatura respiratória e da atividade mucociliar nas exacerbações. O corticóide sistêmico está sempre indicado nos quadros de exacerbação aguda, infecciosa ou não, na dose de 20 a 40 mg por dia durante uma semana. O uso de corticóide inalatório está indicado somente ao subgrupo de pacientes estáveis com VEF1<50% do previsto e exacerbações frequentes (maiores ou iguais a três exacerbações ao ano).

É importante identificar precocemente os pacientes que necessitarão de atendimento hospitalar como aqueles que apresentam fadiga dos músculos respiratórios, estado mental alterado, hipoxemia ou hipercapnia graves, necessidade de ventilação assistida (invasiva ou não) e descompensação cardíaca. A oxigenioterapia é o principal tratamento para os pacientes hipoxêmicos.

Os fatores que podem induzir ao risco maior de fracasso no tratamento da exacerbação da DPOC são: dispneia grave, uso de oxigênio domiciliar, várias intercorrências anteriores nos últimos três meses, mais de quatro exacerbações no ano anterior, uso de esteróides sistêmicos e internações prévias (evidência níveis II e III). O fracasso no tratamento da exacerbação aguda envolve elevado custo econômico, relacionado ao excesso de internações hospitalares e consultas

ambulatoriais. Os programas de reabilitação respiratória são de extrema importância na redução do risco de exacerbações. A redução das exacerbações dos quadros infecciosos pode ser obtida com a utilização de vacinas, como a antipneumocócica e a anti-influenza (evidência nível I). Em recente estudo ecológico de séries temporais de mortalidade em idosos no Brasil, notou-se uma diminuição da taxa de mortalidade por doenças respiratórias selecionadas entre homens e mulheres, após a introdução do uso de vacinas contra a influenza, mostra o reflexo positivo no quadro de mortalidade, obtido através da prevenção específica⁹.

PROGNÓSTICO

A intervenção apropriada com o uso de medicamentos, educação dos pacientes e seus familiares, fisioterapia e reabilitação por grupo multidisciplinar de profissionais, pode desacelerar a progressão da DPOC.

Os objetivos fundamentais do tratamento são: atingir a melhora ou remissão dos sintomas, melhora na qualidade de vida, redução do risco de hospitalização, manutenção da função pulmonar e redução da mortalidade.

A utilização de medicamentos associados, como o uso de corticóides inalatórios e beta-2 de ação prolongada, além do tiotrópio, reduzem as exacerbações, melhoram a qualidade de vida e diminuem a mortalidade em portadores de DPOC. Os efeitos adversos, aderência ao tratamento e efetividade podem ser diferentes na prática clínica em comparação aos resultados encontrados na literatura e isto se deve a vários fatores, como os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes e perdas nas amostras durante os estudos¹⁰.

Conclui-se que o tratamento da DPOC deve ser individualizado a partir das características do paciente, de acordo com os critérios de gravidade e diretrizes baseadas nas evidências clínicas existentes no momento.

REFERÊNCIAS

1. Menezes AM, Perez-Padilha R, Jardim JR. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005; 366:1875-81.
2. Devereux G. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ*. 2006; 332:1142-4.
3. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *J Bras Pneumol*. 2004; 30(5):S1-42.
4. Celli BR. American thoracic society proposes standards of care of COPD. *Lung & Resp*. 1994; 11(1):7-10.
5. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176:532-55.
6. Sethi S, Murphy TF. Infections in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N England Med*. 2008; 359(22):2355-65.
7. Anthonisen NR, Manfreda J et al. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Annals Internal Medicine*. 1987; 106:196-204.
8. Griffith DE, Mazurek DE. Pneumonia in chronic obstructive lung disease. *Infect Dis Clin North Am*. 1991; 5:467-71.
9. Francisco PMSB, Donalisio MRC, Latorre RDO. Impacto da vacinação contra influenza na mortalidade por doenças respiratórias em idosos. *Rev Saúde Pública*. 2005; 39:75-81.
10. Currie GP, Lipworth BJ. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacological management. *BMJ*. 2006; 332:1439-41.

CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) E O RIM

TEA SINENSIS (*Camellia sinensis*) AND THE KIDNEY

Luis Lázaro Ayusso*, Vinícius Gutierrez Parise**, Tiago Nogueira Spinosa**

RESUMO

O uso de plantas com finalidade terapêutica vem aumentando diariamente em todo o mundo, e essa realidade também é bastante evidente no Brasil. Hoje se sabe que plantas medicinais, da mesma forma que medicamentos sintéticos, possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam no organismo. O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo e o chá verde, derivado da planta *Camellia sinensis*, tem recebido muita atenção devido ao seu papel como antioxidante e neutralizador de radicais livres. O chá verde é o segundo chá mais produzido e consumido (20-22%), sendo superado apenas pelo chá preto (76-78%), e é amplamente bebido na China, Japão, Coréia e Marrocos. Evidências experimentais indicam que ERO desempenham um importante papel fisiopatológico no desenvolvimento da hipertensão arterial e diabetes *mellitus*. Estudos de modelos de ratos hipertensos e diabéticos sugerem que as catequinas do chá verde influenciam o metabolismo glicídico, lipídico e melhoram a função renal, reduzindo o estresse oxidativo. Vários estudos epidemiológicos e clínicos mostraram que o chá verde pode reduzir o risco de muitas doenças crônicas como o diabetes *mellitus*, incluindo doenças cardiovasculares. Catequinas do chá verde podem desempenhar um papel crucial na prevenção da aterosclerose, pois exercem efeitos protetores vasculares através de múltiplos mecanismos, incluindo efeitos antioxidantes, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-proliferativos, anti-trombogênicos, redutores lipídicos, bem como efeitos benéficos sobre a função endotelial. Em qualquer caso, a aterosclerose é um componente importante de doenças renais crônicas e, adicionalmente, recente revisão de evidências clínicas sobre o chá verde concluiu que o mesmo pode atenuar os fatores de risco associados com o desenvolvimento de aterosclerose, diminuindo a incidência de eventos cardiovasculares e infarto. Assim, sugerimos que o consumo de chá verde esteja associado a comportamentos saudáveis, tais como aumento da atividade física, dieta rica em alimentos antioxidantes e abstinência ao fumo; possa ser uma forma eficaz, não-farmacológica, pouco dispendiosa e suficiente para conferir melhorias notáveis. Concluímos que novos estudos clínicos sobre o uso de chá verde são necessários, principalmente aqueles relacionados à função renal de pacientes hipertensos e diabéticos.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Camellia sinensis*. Catequina. Radicais livres.

ABSTRACT

The use of plants for therapeutic purposes has been increasing every day around the world, and this reality is also quite evident in Brazil. Today we know that medicinal plants, just like synthetic drugs, present groups of pharmacologically active compounds which act in human body. Tea is the second most consumed beverage in the world and green tea, extracted from the plant *Camellia sinensis*, has received a great attention, due to its role as an antioxidant and free radical neutralizer. Green Tea is the second most produced and consumed type of Tea (20-22%), being surpassed only by black tea (76-78%), and is widely drunk in China, Japan, Korea and Morocco. Experimental evidence indicates that ROS play an important pathophysiological role in the development of hypertension and diabetes mellitus. Studies about mouse models of hypertension and diabetes suggest that green tea catechin affect glucose also lipid metabolism, improving also kidney function and reducing oxidative stress. Several epidemiological and clinical studies have shown that green tea can reduce the risk of many chronic diseases like diabetes also cardiovascular disease as well. Green tea catechins may play a crucial role in preventing atherosclerosis, because exert vascular protective effects through multiple mechanisms, including antioxidant, anti-hypertensive, anti-inflammatory, anti-proliferative, anti-thrombogenic effects, lowering also lipids, as well as beneficial effects on endothelial function. In any case, atherosclerosis is an important component of chronic kidney diseases and in addition, a recent review of clinical evidence about green tea concluded that it can ease the risk factors associated with the development of atherosclerosis, reducing also the incidence of cardiovascular events and stroke. Accordingly we suggest that green tea consumption, associated with healthy behaviors, such as increased physical activity, diet rich in antioxidant foods and avoidance of tobacco, can be an effective, non-pharmacological and inexpensive tool, effective to provide noticeable improvements. We conclude that further clinical studies on the use of green tea are needed, especially those related to renal function of hypertensive and diabetic patients.

Keywords: Medicinal plants. *Camellia sinensis*. Catechin. Free Radicals.

* Mestre em Nefrologia pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Escola Paulista de Medicina. Especialização em Nefrologia pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas-SP (PUCCAMP). Docente da disciplina de Clínica Médica na área de Nefrologia do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Membro do Conselho Editorial "Ciência, Pesquisa e Consciência" - Revista de Medicina do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino. Contato: layusso@hotmail.com

** Discentes do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.



INTRODUÇÃO

Plantas medicinais

O uso de plantas com finalidade terapêutica vem aumentando dia a dia em todo o mundo, e essa realidade também é bastante evidente no Brasil¹. As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem. O uso de plantas com propriedades curativas é evidenciado desde a era pré-histórica, em que sociedades primitivas buscavam a cura terapêutica e psicoterapêutica através de preparações botânicas². A partir do século XVII, com a introdução do método científico, a contribuição da natureza para a melhoria da qualidade de vida da humanidade passou a ser cada vez maior. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que cerca de 80% da população mundial utilizam, de alguma maneira, formas medicamentosas derivadas de plantas³, e aproximadamente 25% das drogas prescritas no mundo todo são originárias de plantas⁴. Por diversos motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira. Hoje se sabe que plantas medicinais, da mesma forma que medicamentos sintéticos, possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam no organismo. O emprego terapêutico dessas plantas exige o conhecimento desses grupos para a avaliação das potencialidades terapêuticas, tóxicas, e para a formulação de uma estratégia adequada para seu uso¹. Os fitoterápicos de utilização popular são derivados de 25.000 espécies de plantas, sendo que foram catalogadas mais de 365.000 espécies. Desse total, somente cerca de 1.100 espécies já foram estudadas como fonte de compostos biologicamente ativos e, em sua grande maioria, em espécies européias⁵. Atualmente, tem aumentado o interesse em plantas medicinais que são efetivas como tratamento alternativo para muitas doenças humanas⁶.

OBJETIVO

Realizar revisão de literatura médica sobre os benefícios do chá verde (*Camellia sinensis*) na saúde humana, principalmente aqueles relacionados às doenças renais, hipertensão arterial e diabetes *mellitus*.

Radicais livres

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas na vasculatura de uma forma altamente regulamentada. Sinalização de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem importantes propriedades, principalmente através da modificação oxidativa de proteínas e ativação de fatores de transcrição que mantêm a estrutura e função vascular, cardíaca e renal^{7,8}. ERO têm um importante papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, diabetes, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, injúria isquemia-reperfusão e acidente vascular cerebral⁹. Isto é devido, em grande parte, ao excesso de produção de oxidantes, à diminuição da bioviabilidade do óxido nítrico (NO) e à diminuição da capacidade antioxidante na vasculatura e rins¹⁰. A família de ERO compreende muitas moléculas que têm efeitos divergentes sobre a função celular, tais como regulação da diferenciação e crescimento celular, modulação da produção de matrix extracelular, inativação do NO, estimulação de muitas "quinases" e genes pró-inflamatórios¹¹, e aumento da concentração intracelular de cálcio livre, o qual é um grande determinante da reatividade vascular⁸. Importante salientar que muitas dessas ações estão associadas com alterações observadas nas doenças cardiovasculares. O termo estresse oxidativo descreve condições envolvendo aumento dos níveis de ERO, as quais são entidades quimicamente reativas compreendendo dois grandes grupos: radicais livres (e.g., superóxido [O_2^-], hidroxila [OH], óxido nítrico [NO]) e derivativos não radicais de O_2 (e.g., H_2O_2 , ONOO⁻)⁹. Entre as ERO, atenção concentrou-se sobre o radical livre O_2^- , altamente reativo (aumento de seus níveis inativa NO, causando disfunção endotelial e vasoconstrição), e sobre o H_2O_2 , mais estável⁸, ou seja, que atua como um vasodilatador em alguns leitos vasculares, incluindo cerebral, coronariano e artérias mesentéricas⁹. Várias patologias e em particular as acima citadas são influenciadas em diversos graus pelas ERO⁸.

Chá Verde (*Camellia sinensis*)

A história do chá começou há mais de 5.000 anos atrás na China antiga¹². O chá é a segunda bebida

mais consumida no mundo, bem à frente do café, cerveja, vinho e refrigerantes¹³, e sabe-se que atualmente é consumida por 2/3 da população mundial¹². O interesse social e econômico do chá é claro e seu consumo é parte da rotina diária de muitas pessoas, como uma bebida cotidiana e como um auxílio terapêutico em muitas doenças. Dependendo do processo de fabricação, os chás são classificados em três tipos principais: "não-fermentados" chá verde (produzido por secagem e aquecimento das folhas frescas para inativar a enzima polifenol oxidase e, portanto, a oxidação não ocorre); "semi-fermentado" chá *oolong* ou também conhecido como chá amarelo (produzido quando as folhas frescas são submetidas a um estágio de fermentação parcial antes da secagem) e "fermentados" preto e vermelho (chás que passam por um tratamento pós-colheita de fermentação antes da secagem e aquecimento)¹³. McKeay e Blumberg¹⁴ relataram um consumo *per capita* médio do chá no mundo de 120ml/dia. O chá verde é o segundo chá mais produzido e consumido (20-22%), sendo superado apenas pelo chá preto (76-78%), e é amplamente bebido na China, Japão, Coreia e Marrocos. Embora os benefícios de saúde tenham sido atribuídos ao consumo de chá verde, desde o início de sua história, as investigações científicas sobre a bebida e seus componentes estão em curso há menos de três décadas¹³. Chá verde é derivado da planta *Camellia sinensis*¹², tem recebido muita atenção devido ao seu papel como um antioxidante e neutralizador de radicais livres¹⁵. A planta *Camellia sinensis* pertence à família *Theaceae*, é conhecida popularmente por chá verde ou chá da Índia¹⁶. É um arbusto ou árvore (Figura 1) sempre-viva e pode crescer a alturas de, aproximadamente, 9 metros, mas geralmente podadas para cultivo entre 60cm e 1,5 metro. As folhas são verde-escuro, com bordas serrilhadas, alternadas e ovais, e as flores são brancas, perfumadas e aparecem em cachos ou isoladamente (Figura 2: A e B)¹⁷. Composição química do chá verde é complexa: *proteínas* (15-20% do peso seco); *aminoácidos* (1-4% do peso seco), como tianina, ácido glutâmico, triptofano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina, lisina; *carboidratos* (5-7% do peso seco), como a celulose, pectinas, glicose, frutose,

sacarose; *lipídios* como ácido linolêico; *esteróis* como estigmasterol; *vitaminas* (B, C, E); cafeína e teofilina; *pigmentos* como clorofila e carotenóides, e *compostos voláteis* como aldeídos, álcoois, ésteres, lactonas, hidrocarbonetos; *minerais* e *oligoelementos* (5% do peso seco), como Ca, Mg, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, Na, P, Co, Sr, Ni, K, F e Al¹³.

Tabela 1 - Resumo da composição média (%) do Chá Verde^{13*}

COMPOSIÇÃO	CHÁ VERDE
Polifenóis	30%
Fibras	26%
Proteínas	15%
Carboidratos	7%
Lipídios	7%
Minerais	5%
Aminoácidos	4%
Pigmentos	2%

*(modificado)

A ingestão total de polifenóis é de, aproximadamente, um grama por dia, dependendo do estilo de vida e preferências alimentares¹². Polifenóis são os mais abundantes antioxidantes dietéticos, sendo componentes comuns de frutas, legumes, cereais, nozes, sementes, chocolate e bebidas, como chá, café ou vinho. Eles têm sido utilizados para levar muitos benefícios à saúde, tais como prevenção do câncer¹⁸, doenças neurodegenerativas¹⁹, doenças cardiovasculares²⁰, diabetes²¹, efeitos antienvhecimento²², sobre a densidade óssea, função cognitiva, cárie dentária e nefrolitíase¹³, entre outros efeitos. Polifenóis constituem o grupo mais interessante de componentes de folhas de chá verde, o qual pode ser considerado uma importante fonte alimentar de polifenóis, em especial flavonóides. Os flavonóides são derivados fenóis sintetizados em quantidades substanciais (0,5-1,5%) e variedade (mais de 4.000 identificados) e amplamente distribuídos entre as plantas. Os principais flavonóides presentes no chá verde incluem catequinas¹³. As catequinas são polifenóis predominantes no chá verde, constituindo, aproximadamente, 30% do peso seco da folha da planta *Camellia sinensis*¹², são potentes antioxidantes, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação^{1,16}. As catequinas mais abundantes encontradas nas folhas do chá são (-) epigallocatequina 3-O-galato [(-) EGCG], que representa 59% do total de catequinas, (-) epigallocatequina [(-) EGC], 19% aproximadamente, (-) epicatequina-3-galato (ECG) 13,6% aproximadamente

e (-)-epicatequina (EC) 6,4% aproximadamente¹². O chá verde também contém ácido gálico e outros ácidos fenólicos como ácido clorogênico e ácido cafeico, e flavonóis, como canferol, mircetina e quercetina¹³. EGCG, o principal polifenol do chá verde, foi sugerido participar na eliminação de toxinas urêmicas e, assim, melhorar os distúrbios renais^{2,23}. Wu e Wei indicaram que uma xícara de chá verde (2,5g de folhas de chá verde/200ml de água) pode conter 90 mg de EGCG²⁴. Por exemplo, uma dose de 300mg diariamente de EGCG pode ser capaz de induzir efeitos metabólicos favoráveis na oxidação de gorduras²⁵. Os mecanismos dos polifenóis do chá verde foram sugeridos como se segue: 1º) os polifenóis aumentam a atividade biológica da *superóxido dismutase* (SOD) e *glutathione peroxidase*, que inativam os radicais livres de oxigênio como O₂⁻, e podem reduzir a perda de NO mantendo sua função fisiológica; 2º) os polifenóis do chá verde podem inibir a síntese de tromboxane A2 (TXA2), leucotrienos¹⁵ e endotelina 1 (ET1)²⁶. Os potentes efeitos vasoconstritores do TXA2 e leucotrienos contribuem na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Existem depósitos de angiotensina II intrarenal e excessiva expressão de receptores tipo I de angiotensina II tem sido observada na medula renal¹⁵.

Os efeitos prejudiciais sobre o consumo do chá verde são devido a três fatores principais: (1) ao seu teor de cafeína, (2) presença de alumínio e (3) efeitos dos polifenóis do chá sobre a biodisponibilidade do ferro. Os efeitos negativos produzidos pela cafeína são nervosismo, distúrbios do sono, vômitos, dores de cabeça, dor epigástrica, taquicardia. Assim, o chá verde não deve ser tomado por pacientes que sofrem de doenças cardíacas ou grandes problemas cardiovasculares. Grávidas e mulheres a amamentar não devem beber mais do que 1-2 xícaras/dia, pois pode provocar um aumento do ritmo cardíaco. Quanto à presença de alumínio no chá verde, alguns estudos revelaram a elevada capacidade da planta de acumular Al, e este aspecto é importante para pacientes com insuficiência renal. Assim, estudos futuros projetados para avaliar com precisão a presença e a biodisponibilidade de Al nas folhas do chá verde são necessários¹³. Há relatos de casos com hepatotoxicidade

relacionados ao consumo de chá verde. Os casos isolados de insuficiência hepática aguda devido ao consumo de polifenóis do chá verde²⁷⁻³⁰, quando comparados com o número de participantes envolvidos em ensaios clínicos controlados com a intervenção humana³¹⁻³³ e estudos epidemiológicos^{34,35}, sugerem que outros fatores desconhecidos podem ter contribuído para a hepatotoxicidade. Recente estudo prospectivo com objetivo de testar a função hepática e renal realizou suplementação de altas doses de polifenóis (714mg/dia) do chá verde em homens saudáveis durante três semanas, não causou efeitos colaterais ou prejudicou a função hepática e renal³⁶. Entre todos os chás consumidos no mundo, o chá verde é o mais estudado para benefícios da saúde¹². Além de todas as propriedades anteriormente mencionadas, que contribuíram para o reconhecimento do chá verde como alimento funcional por alguns autores, não é para esquecer o seu uso corrente na preparação de uma variedade de alimentos, produtos farmacêuticos, cremes dentais e cosméticos¹³.



Figura 1 - Arbusto de *Camellia sinensis*³⁷



Figura 2A - *Camellia sinensis*³⁸



Figura 2B - *Camellia sinensis* com sua flor³⁸

Estudos científicos experimentais e eficácia do chá verde (*Camellia sinensis*)

Hipertensão arterial

Evidências experimentais indicam que ERO desempenham um importante papel fisiopatológico no desenvolvimento da hipertensão arterial. Isto é devido, em grande parte, ao estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade de NO no endotélio vascular e rins. Modelos de ratos deficientes em enzimas geradoras de ERO têm pressão arterial baixa em comparação com ratos selvagens, nos quais infusão de angiotensina II não induziu hipertensão arterial⁷. Na hipertensão, a disfunção de enzimas tais como NAD(P)H oxidase, NO sintase, xantina oxidase, enzimas mitocondriais ou superóxido dismutase que geram O_2^- , H_2O_2 e radical hidroxila, ou reduzida varredura por antioxidantes, resulta em aumento na formação de ERO, que tem ações prejudiciais sobre a vasculatura. Radicais livres em hipertensão contribuem à injúria vascular por promover crescimento celular vascular, deposição de matrix extracelular, inflamação, disfunção endotelial e aumento do tônus vascular⁸. Estudo realizado em ratos espontaneamente hipertensos concluiu que o estresse oxidativo aparece antes da inflamação como uma anormalidade primária no rim desses animais³⁹, e foi confirmado em muitos modelos animais de hipertensão e doença renal, bem como está associado com fibrose renal, vasoconstrição, apoptose, redução da excreção de sódio⁴⁰ e nefrosclerose hipertensiva sal dependente⁴¹. Os mecanismos que conduzem ao excesso de produção de ERO no interior do rim estão começando a ser entendidos. Está evidente que tanto uma redução na produção de NO⁴⁰, elevações de hormônios como a

angiotensina II, aumento na concentração de sódio tubular ou extracelular podem estimular o aumento no estresse oxidativo no interior medular da alça espessa ascendente de Henle e contribuir para hipertensão e injúria renal^{40,42}. A elevação da pressão de perfusão renal (PPR) secundária a hipertensão pode contribuir de forma importante para a progressão da lesão renal, geralmente observada na hipertensão arterial⁴³, como demonstrado em dois modelos de ratos hipertensos^{44,45}. Nos rins expostos a alta PPR, moléculas relacionadas com as vias de estresse oxidativo, como por exemplo, TGF- β e NF- κ -B, exibiram expressão reforçada em comparação com o rim protegido de pressão. Rins expostos a maior pressão de perfusão também exibiram maior esclerose glomerular e tubular medular, e fibrose intersticial com uma exagerada expressão de genes relacionados com as vias do estresse oxidativo e apoptose⁴⁵ quando comparada com o rim protegido de pressão. Estes resultados indicam que a PPR, de alguma maneira, estimulou o estresse oxidativo e contribuiu para a progressão da hipertensão arterial e lesão renal. Foi demonstrado que elevações na PPR aumentam o fluxo sanguíneo medular e a pressão hidrostática intersticial renal, e estes parâmetros indiretamente também avaliam os mecanismos responsáveis pelas mudanças observadas de H_2O_2 no exterior da medula. Neste mesmo sentido, recentemente, em estudo experimental, concluiu-se que elevação na PPR estimula a liberação de NO e H_2O_2 no exterior da medula renal. Os mecanismos responsáveis pela liberação destas importantes moléculas vasoativas diferem, sendo que o NO parece ser estimulado pelo aumento do fluxo sanguíneo medular, enquanto o aumento de H_2O_2 resulta do aumento da oferta de NaCl na alça espessa ascendente medular de Henle. O equilíbrio da produção de H_2O_2 e NO no exterior da medula é, portanto, importante consideração para o entendimento das inter-relações entre PPR, excreção de sódio e controle em longo prazo da pressão arterial sistêmica. Sendo assim, desenvolvimento de agentes antioxidantes que possam efetivamente reduzir a produção na medula renal de O_2^- e H_2O_2 podem ser mais benéficos clinicamente do que aqueles que visam uma maior produção de NO, por exemplo, L-arginina⁴⁶.

Angiotensina II induz disfunção endotelial que é crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e hipertensão. Estudo experimental concluiu que o chá verde preveniu lesões de órgãos alvo e hipertensão induzida por altas doses de angiotensina II, provavelmente por prevenção ou eliminação da geração de ânion superóxido⁴⁷. A administração de EGCG para ratos espontaneamente hipertensos melhorou a função endotelial, a sensibilidade à insulina e reduziu a pressão arterial⁴⁸, além disso, o chá pode atenuar o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda induzida por hipertensão renovascular em ratos^{49,50}. Estes resultados podem ser relevantes para a compreensão dos benefícios para a saúde cardiovascular e metabólica do consumo de chá verde em seres humanos⁴⁸.

Diabetes mellitus

Diabetes *mellitus* é caracterizada por hiperglicemia, a qual tem sido fortemente ligada a complicações como neuropatia, retinopatia e nefropatia diabética. Acima de tudo, os diabéticos são de alto risco para doença renal terminal secundária à nefropatia diabética. Controle rigoroso da hiperglicemia pela insulinoterapia tem demonstrado evitar hipertrofia e hiperfiltração glomerular e o subsequente aumento da excreção urinária de proteína⁵¹. A nefropatia diabética é essencialmente de origem metabólica e hemodinâmica, além da interação dos resultados entre a suscetibilidade genética e fatores ambientais⁵². Cada vez mais evidências mostram envolvimento de dois importantes mecanismos na patogênese da nefropatia diabética, diferentes da proteína quinase C (PKC) e da via polioliol, ou seja, estresse oxidativo^{53,54} e produtos finais da glicosilação avançada (PFGA). Aumento do estresse oxidativo está envolvido com alterações estruturais renais, devido às substâncias oxidativas, afetando diretamente as células endoteliais glomerulares, infiltrando as regiões mesangiais, túbulo-intersticial e em outras partes do tecido renal, consequentes ao abundante fluxo sanguíneo no rim diabético. A formação de PFGA, um dos distúrbios metabólicos causados pela hiperglicemia, também têm sido fortemente implicado na patogênese das doenças macro e microvasculares diabéticas, cujas proteínas

modificadas pelos PFGA podem estimular uma variedade de respostas celulares através de um receptor de superfície celular específico tal como RAGE, resultando na expressão e ativação de mediadores patogénéticos, por exemplo, estresse oxidativo da matrix extracelular, citocinas e fatores de crescimento. Recentemente, foi bem documentado que um aumento na produção de superóxido no interior da mitocôndria é um *link* causal entre hiperglicemia e dano celular induzido pela formação de PFGA, ativação da PKC e acúmulo de sorbitol⁵⁴. Hiperglicemia e hipertensão podem ativar várias vias que levam ao aumento da geração de superóxido e outras ERO¹⁰. Algumas destas vias incluem o aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial induzida pela hiperglicemia⁵⁵; o aumento da expressão e desacoplamento da sintase óxido nítrico endotelial, levando a uma maior produção de superóxido em relação ao óxido nítrico⁵³ e ativação das formas reduzidas de NADPH³⁹. O último sistema está presente em diferentes tipos de células renais⁵⁵ e pode contribuir para a lesão renal na presença de diabetes ou hipertensão. Recentemente, mostrou-se que a hipertensão aumenta o estresse oxidativo renal, elevando a produção de superóxido NADPH-dependente e diminuindo as defesas antioxidantes em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ)⁵⁶. Estratégias que reduzam a formação de superóxido via NADPH oxidase e/ou aumentem a atividade dos sistemas de defesa antioxidante podem atenuar a lesão renal induzida pela hiperglicemia⁵⁵.

Chá verde é uma fonte rica de polifenóis, particularmente catequinas, que têm mostrado ter numerosos efeitos farmacológicos. Estudos utilizando modelos animais mostram que as catequinas do chá verde podem ser benéficas para reprimir obesidade secundária a dieta rica em gorduras, modulando o metabolismo lipídico e fornecendo alguma proteção contra os transtornos do metabolismo lipídico e glicídico implicados no diabetes tipo 2, e poderiam reduzir o risco de doenças cardiovasculares⁵⁴. Em ratos diabéticos induzidos por STZ ou por aloxano, com nefropatia diabética, a administração do chá verde melhorou a função renal^{51,54} por sua ação anti-trobogênica⁵⁴; reduziu proteinúria, excreção de

creatinina, atividade urinária de enzimas do epitélio tubular renal⁵¹, peroxidação lipídica⁵⁴, glicemia^{51,54} e concentrações de hemoglobina glicosilada⁵¹; atenuou a retinopatia e a produção renal de ERO mitocondrial⁵⁵; impediu o acúmulo de glicogênio nos túbulos renais⁵¹ e aumentou a enzima *superóxido dismutase*⁵⁴. Estes estudos sugerem que as catequinas do chá verde influenciam o metabolismo glicídico, lipídico e melhoram a função renal, reduzindo o estresse oxidativo. Já em outro estudo, as catequinas do chá verde diminuíram os níveis séricos de insulina, mas não alteraram os níveis plasmáticos de glicose em um teste oral de tolerância a glicose em ratos normais. Dada a importância das relações recíprocas entre a resistência à insulina e disfunção endotelial na fisiopatologia do diabetes e doenças cardiovasculares, os resultados deste estudo podem ser relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos benéficos do consumo de chá verde para melhorar a saúde cardiovascular e metabólica, bem como a mortalidade global⁵⁴. Ribaldo e colaboradores testaram a hipótese de que o chá verde e suas propriedades antioxidantes atenuam lesão renal em ratos diabéticos hipertensos e exploraram mecanismos moleculares subjacentes. Assim, observaram os efeitos do chá verde sobre a expressão da Nox4 NADPH oxidase, que é uma grande fonte de produção de ERO no rim. Os resultados mostraram que o chá verde melhorou a albuminúria e o acúmulo de colágeno IV renal, além de reduzir marcadores de estresse oxidativo renal em ratos diabéticos e espontaneamente hipertensos. O mecanismo subjacente a estes efeitos benéficos, aparentemente, envolve a baixa regulação da expressão de Nox4 NADPH oxidase. No entanto, o chá verde não afetou a pressão arterial ou glicemia desses mesmos ratos. Os autores concluíram que o chá verde melhora lesão renal em ratos diabéticos hipertensos por inibição do estresse oxidativo através da baixa regulação da expressão de Nox4, e sugerem que o consumo do chá verde pode ser benéfico em pacientes diabéticos hipertensos⁵⁵.

Estudos clínicos do chá verde na hipertensão arterial e diabetes mellitus

Diabetes *mellitus* e hipertensão são as causas mais importantes de nefropatia e estágio final de doença renal

terminal. Um recente relatório mostra que o diabetes *mellitus* constitui cerca de metade e hipertensão constitui cerca de um terço dos novos casos de doença renal terminal⁵⁶. Estudos clínicos sugerem que radicais livres são importantes mediadores na fisiopatologia glomerular e doença renal progressiva⁵⁷.

Hipertensão arterial

Estudos demonstram aumento na produção de ERO em pacientes com hipertensão essencial, principalmente os indivíduos sal-sensíveis, hipertensão renovascular, hipertensão maligna e pré-eclampsia. Pacientes com hipertensão arterial tem níveis diminuídos de antioxidante *glutathione* e a atividade da enzima *superóxido dismutase* está reduzida. Modalidades terapêuticas para modificar a biodisponibilidade de ERO, diminuindo a produção e/ou através de um aumento na varredura de radicais livres, podem regredir a remodelação vascular, evitar novas lesões vasculares e danos em órgãos-alvo, em especial os rins, e reduzir a pressão arterial em pacientes hipertensos⁷. Informações sobre o efeito do consumo de chá na saúde humana são escassas, principalmente em populações idosas²⁵. No entanto, o consumo de chá especialmente o verde na saúde humana tem sido observado⁵⁸. Vários estudos epidemiológicos e clínicos mostraram que o chá verde pode reduzir o risco de muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares^{15,25}. Catequinas do chá verde podem desempenhar um papel crucial na prevenção da aterosclerose, pois exercem efeitos protetores vasculares através de múltiplos mecanismos, incluindo efeitos antioxidantes, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-proliferativos, anti-trombogênicos, redutores lipídicos, bem como efeitos benéficos sobre a função endotelial^{25,59}. Além disso, existem evidências de efeitos no miocárdio dos componentes do chá, incluindo efeitos inotrópicos positivos e anti-hipertróficos, e o impacto benéfico na isquemia do miocárdio e reperfusão⁶⁰. Em particular, uma vez que o chá verde reduz a pressão arterial, pode diminuir o risco de acidente vascular cerebral e insuficiência coronariana²⁵. Recente meta-análise de um total de nove estudos (194.965 indivíduos agrupados) observou 4.378 acidentes vasculares cerebrais e concluiu que o consumo de, pelo menos, três xícaras, tanto do chá preto como verde, podem reduzir o risco de acidente vascular cerebral isquêmico em

21%⁶¹. Outro estudo recente realizado no Japão investigou a associação entre o consumo de chá verde e todas as causas de mortalidade, como câncer e doenças cardiovasculares. Os pesquisadores analisaram 12.251 indivíduos entre 65 e 84 anos de idade, através de questionários completos que incluíram frequência do consumo de chá verde e foram seguidos por até seis anos. Pessoas que bebiam sete ou mais xícaras de chá verde por dia apresentaram um risco 55% menor para todas as causas de mortalidade e um risco 75% menor de mortalidade para doenças cardiovasculares em comparação com pessoas que bebiam menos de uma xícara de chá verde por dia⁶².

Diabetes mellitus

Hipertensão e diabetes, frequentemente, coexistem, e a presença destas duas condições aumenta significativamente o risco de nefropatia. Assim, glicemia e pressão arterial estão entre as manobras mais eficazes para o tratamento e prevenção da doença renal diabética. Estudos clínicos⁵⁴ sugerem que não há ainda um tratamento completamente eficaz para a nefropatia diabética. Hiperglicemia é o principal fator responsável pelas alterações estruturais a nível renal e está diretamente relacionada às complicações microvasculares diabéticas, principalmente nos rins. Assim, o controle glicêmico continua sendo o principal alvo do tratamento. No entanto, muitos estudos têm revelado que a produção acelerada da peroxidação lipídica pelo estresse oxidativo está aumentada nas lesões glomerulares de pacientes diabéticos com nefropatia diabética incipiente ou avançada. Dessa forma, é necessário investigar os efeitos do estresse oxidativo e formação de PFGA, a fim de avaliar novos agentes terapêuticos que possam prevenir ou retardar o desenvolvimento da nefropatia diabética⁵⁴. Estudos mostraram que o controle da hiperglicemia pós-prandial pelo chá verde pode ajudar a reduzir o risco de diabetes tipo 2 e fornecer evidências que o chá promove o metabolismo da glicose em humanos saudáveis^{51,63}. Foi revelado que consumo moderado (ou seja, 1-2 xícaras por dia) de chá no longo prazo está relacionado a uma redução significativa nos níveis de glicemia em jejum e, conseqüentemente, com menor risco de diabetes, independentemente de várias outras características clínicas

e estilo de vida^{64,65}. Mas alguns estudos não suportam estes achados^{25,66}. Este resultado observado é de grande importância para a saúde pública, uma vez que o diabetes é uma das principais causas de incapacidade e morte nas pessoas idosas e o consumo de chá parece ser um meio efetivo não-farmacológico para reduzir a incidência do diabetes e suas conseqüências para a saúde. Em outro estudo recente com cerca de 17.300 japoneses, realizado com homens e mulheres de meia idade, foi demonstrado que o consumo de chá verde entre 1 a 6 xícaras por semana foi associado a um risco 34% menor de diabetes (tipo 2) após cinco anos de seguimento⁶⁷. Isto levou à sugestão de que as ações benéficas do chá na prevenção de várias doenças crônicas podem ser devido a sua capacidade de reduzir a susceptibilidade das lipoproteínas de baixa densidade à oxidação, suprimir a expressão de células do endotélio vascular de citocinas pró-inflamatórias e alta regulação na sequência de moléculas de adesão e adesão de monócitos⁶⁸. Vários dados epidemiológicos e clínicos mostraram que o chá pode beneficiar a saúde humana através de vários caminhos²⁵.

Tendo em vista o papel dos processos oxidativos em causar dano que leva a glomerulosclerose e fibrose intersticial renal medular, poderá ser dedicada maior atenção à utilização de componentes de alimentos antioxidantes e o uso de drogas com reconhecido potencial antioxidante. Em qualquer caso, a aterosclerose é um componente importante de doenças renais crônicas⁶⁹ e, adicionalmente, recente revisão de evidências clínicas sobre o chá verde concluiu que o mesmo pode atenuar os fatores de risco associados com o desenvolvimento de aterosclerose, reduzindo a incidência de eventos cardiovasculares e infarto⁷⁰.

Assim, sugerimos que o consumo de chá verde esteja associado a comportamentos saudáveis, tais como aumento da atividade física, dieta rica em alimentos antioxidantes e abstinência ao fumo; possa ser uma forma eficaz, não-farmacológica, pouco dispendiosa e suficiente para conferir melhorias notáveis. Diante desta revisão, concluímos que novos estudos clínicos sobre o uso de chá verde são necessários, principalmente aqueles relacionados à função renal de pacientes hipertensos e diabéticos.

Agradecimentos

À colaboração e coautoria no texto de Felipe Ciconelli Peixoto, médico graduado pelas FIPA, e de Luis Ayusso Neto, acadêmico em Medicina.

REFERÊNCIAS

1. Peron AP, Marcos MC, Cardoso SC, Vicentini VEP. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cássia angustifolia* vahl em sistema teste vegetal. *Arq Ciênc Saúde Unipar*. 2008; 12:51-4.
2. Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol*. 2005; 15:686-99.
3. Paulino NJ. Análise farmacológica de extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* e de seus constituintes sobre a traquéia isolada de cobaia. Dissertação. São Paulo/UNIFESP; 1996.
4. Barros ME, Lima R, Mercuri LP et al. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. *Urol Res*. 2006; 34:351-7.
5. Barros ME, Boim MA, Schor N. Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) e litíase urinária. In: Cruz J, Cruz HMM, Kirsztjan GM, Barros RT, coordenadores. *Atualidades em nefrologia 10*. São Paulo: Sarvier; 2008, p 343-8.
6. Torres DSC, Cordeiro I, Giulietti AM. O gênero *Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae*) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2003; 17:265-78.
7. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44:248-52.
8. Xu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodeling in hypertension: Still alive. *Can J Cardiol*. 2006; 22:947-51.
9. Paravicini T, Touyz RM. NADPH Oxidase, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care*. 2008; 31:170-80.
10. Vaziri ND, Rodrigues-Inturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2:582-93.
11. Harrison DG, Widder J, Grumbach I et al. Endothelial: mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 2006; 259:351-63.
12. Chen D, Milacic V, Chen MS et al. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol*. 2008; 23:487-96.
13. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea-a review. *J Am Coll Nutr*. 2006; 25:79-99.
14. Mckay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr*. 2002; 21:1-13.
15. Shin BC, Ryu HH, Chung JH et al. The Protective Effects of green tea extract against L-arginine toxicity to cultured human mesangial cells. *J Korean Med Sci*. 2009; 24:204-9.
16. Schimitz W, Saito AY, Estevão D et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina*. 2005; 26:119-30.
17. Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev*. 2000; 5:144-51.
18. Landis-Piwowar KR, Huo C, Chen D, Milacic V, Shi G, Chan TH, et al.. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res*. 2007; 67:4303-10.
19. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 2004; 88:1555-69.
20. Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, et al. Samman N, Agbor GA. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:8071-6.
21. Kowluru RA, Kanwar M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab*. 2007; 4:1-8.
22. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006; 444:337-42.
23. Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A. The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr*. 2006; 25:790-6.
24. Wu CD, Wei GX. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*. 2002; 18:443-4.
25. Panagiotakos DB, Lionis C, Zeimbekis A, Gelastopoulou K, Papairakleous N, Das UN, et al. Long-term tea intake is associated with reduced prevalence of (type 2) Diabetes Mellitus among elderly people from mediterranean islands: MEDIS Epidemiological Study. *Yonsei Med J*. 2009; 50:31-8.
26. Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology*. 2010; 151(1):103-14.
27. Federico A, Tiso A, Loguercio C. A case of hepatotoxicity caused by green tea. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:474.
28. Jimenez-Saenz M, Martinez-Sanchez Mdel C. Acute hepatitis associated with the use of green tea infusions. *J Hepatol*. 2006; 44:616-7.
29. Gloro R, Hourmand-Ollivier I, Mosquet B, Mosquet L, Rousselot P, Salamé E, et al. Fulminant hepatitis during self-medication with hydroalcoholic extract of green tea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 17:1135-7.
30. Molinari M, Watt KD, Kruszyna T, Nelson R, Walsh M, Huang WY, et al. Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. *Liver Transpl*. 2006; 12:1892-5.
31. Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity*. 2007; 15:1473-83.
32. Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, et al. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(1):122-9.
33. Matsuyama T, Tanaka Y, Kamimaki I, Nagao T, Tokimitsu I. Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(6):1338-48.
34. Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Tokudome S, Akamatsu T, Moriyama T, Zakouji H. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int J Epidemiol*. 1998; 27(3):438-43.
35. Imai K, Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ*. 1995; 310:693-6.
36. Frank J, George TW, Lodge JK, George TW, Lodge JK, Rodriguez-Mateos M, et al. Daily consumption of an aqueous green tea extract supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in healthy men. *J Nutr*. 2009; 139:58-62.
37. Para emagrecer. Chá branco. [acesso em 2010 set 20]. Disponível em: <http://paraemagrecer.net/2008/09/05/cha-branco/>
38. Blanco RA. Os benefícios do chá verde. *Camellia sinensis*. [acesso em 2010 set 20]. Disponível em: <http://devaneioschineses.blogspot.com/2009/01/os-beneficios-do-ch-verde-camellia.html>
39. Biswas SK, de Faria JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radic Res*. 2007; 41:216-24.
40. Cowley AW Jr. Renal medullary oxidative stress, pressure-natriuresis and hypertension. *Hypertension*. 2008; 52:777-86.
41. Trollet MR, Rudd MA, Loscalzo J. Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2001; 24:116-23.
42. Mori T, O'Connor PM, Abe M, Cowley AW Jr. Enhanced superoxide production in renal outer medulla of Dahl salt-sensitive rats reduces nitric oxide tubular-vascular cross-talk. *Hypertension*. 2007; 49(6):1336-41.
43. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007; 298(17):2038-47.
44. Mori T, Cowley AW Jr. Role of pressure in angiotensin II-induced renal injury: chronic servo-control of renal perfusion pressure in rats. *Hypertension*. 2004; 43:752-9.
45. Mori T, Polichnowski A, Glocka P, Kaldunski M, Ohsaki Y, Liang M, Cowley AW Jr. High perfusion pressure accelerates renal injury in salt sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19:1472-82.
46. Jin C, Hu C, Polichnowski A, Mori T, Skelton M, Ito S, Cowley AW Jr. Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production. *Hypertension*. 2009; 53(6):1048-53.
47. Antonello M, Montemurro D, Bolognesi M, Di Pascoli M, Piva A, Grego F, et al. Prevention of hypertension, cardiovascular damage

- and endothelial dysfunction with green tea extracts. *Am J Hypertens.* 2007; 20(12):1321-8.
48. Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292(5):1378-87.
49. Mao W, Song Y, Han C, Li N. Molecular mechanism by which green tea and tea extract inhibits left ventricle hypertrophy induced by renovascular hypertension in rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2008; 37:43-6.
50. Paparella L, Ceolotto G, Montemurro D et al. Green tea attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rats by modulating reactive oxygen species production and the Src/epidermal growth factor receptor/Akt signaling pathway. *J Nutr.* 2008; 138:1596-601.
51. Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, Asfar S. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Br J. Nutr.* 2008; 100(3):652-9.
52. Giunti S, Barit D, Cooper ME. Mechanism of diabetic nephropathy: Role of hypertension. *Hypertension.* 2006; 48:519-26.
53. Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal oxide production. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(11):2945-52.
54. Yamabe N, Kang KS, Park CH, Tanaka T, Yokozawa T. 7-O-Galloyl-D-sedoheptulose is a novel therapeutic agent against oxidative stress and advanced glycation endproducts in the diabetic kidney. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32:657-64.
55. Ribaldo PD, Souza DS, Biswas SK, Block K, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Green tea (*Camellia sinensis*) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in diabetic spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2009; 139(1):96-100.
56. Biswas SK, Peixoto EB, Souza DS, Faria JBL. Hypertension increases pro-oxidant and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. *Am J Nephrol.* 2008;28:133-42.
57. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M et al. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:16-28.
58. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 2006; 78:2073-80.
59. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* 2008; 15:1840-50.
60. Jochmann N, Baumann G, Stangl V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11:758-65.
61. Arab L, Liu W, Elashoff D. Green and black tea consumption and risk of stroke. A meta-analysis. *Stroke.* 2009; 40:1786-92.
62. Suzuki E, Yorifuji T, Takao S, Komatsu H, Sugiyama M, Ohta T, Ishikawa-Takata K, Doi H. Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: the prospective Shizuoka elderly cohort. *Ann Epidemiol.* 2009; 19(10):732-9.
63. Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. Therapeutic potential of (2)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharm Exper Therap.* 2006; 319:228-36.
64. Polychronopoulos E, Zeimbekis A, Kastorini CM, Papairakleous N, Vlachou I, Bountziouka V, et al. Effects of black and green tea consumption on blood glucose levels in non-obese elderly men and women from Mediterranean Islands (MEDIS epidemiological study). *Eur J Nutr.* 2008; 47(1):10-6.
65. Nahas R, Moher M. Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes – Clinical Review. *Canadian Family Physician.* 2009; 55:591-6.
66. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50:218-28.
67. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med.* 2006; 144:554-62.
68. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* 2006; 55:2180-91.
69. Wardle EN. Antioxidants in the prevention of renal disease. *Ren Fail.* 1999; 21:581-91.
70. Clement Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* 2009; 49:83-7.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A **Ciência, Pesquisa e Consciência** revista do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino de Catanduva, com periodicidade anual, tem por objetivo proporcionar à comunidade científica a publicação de artigos relacionados à área da saúde. Objetiva também publicar suplementos sob a forma de coleções de artigos que abordem tópicos ou temas relacionados à saúde. O artigo deve ser inédito, isto é, não publicado em outros meios de comunicação.

As normas de um periódico estabelecem os princípios éticos na condução e no relatório da pesquisa e fornecem recomendações com relação aos elementos específicos da edição e da escrita. Visa melhorar a qualidade e a clareza dos textos dos artigos submetidos à revista, além de facilitar a edição. Os Editores recomendam que os critérios para autoria sejam contribuições substanciais à concepção e ao desenho, ou à coleta, análise e à interpretação de dados; redação do artigo ou revisão crítica visando manter a qualidade do conteúdo intelectual; e aprovação final da versão a publicar.

CATEGORIAS DE ARTIGOS DA REVISTA

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalho de pesquisa com resultados inéditos que agreguem valores à área da saúde. Sua estrutura deve conter: resumo, descritores (palavras-chave), introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão, conclusões e referências. Sua extensão limita-se a 15 páginas. O artigo original não deve ter sido divulgado em nenhuma outra forma de publicação ou em revista nacional.

ARTIGOS DE REVISÃO: avaliação crítica e abrangente sobre assuntos específicos e de interesse da área médica, já cientificamente publicados. Os artigos deverão conter até 15 páginas. Recomenda-se que o número de referências bibliográficas limite-se no mínimo de 30.

ARTIGOS DE ATUALIZAÇÃO OU DIVULGAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos sobre novas técnicas ou procedimentos globais e atuais em que se encontram determinados assuntos investigativos. Os artigos deverão conter até 10 páginas.

ESPAÇO ACADÊMICO: destinado à divulgação de estudos desenvolvidos durante a graduação, em obediência às mesmas normas exigidas para os artigos originais. O nome do orientador

deverá ser indicado em nota de rodapé e deverão conter, no máximo, 10 páginas.

RELATOS DE CASO(S): descrição de casos envolvendo pacientes, ou situações singulares, doenças raras ou nunca descritas, assim como formas inovadoras de diagnóstico ou tratamento. O texto em questão aborda os aspectos relevantes que devem ser comparados com os disponíveis na literatura. Deverá ser enviada cópia do Parecer do CEP.

RESENHAS E REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS: análise crítica da literatura científica, publicada recentemente. Os artigos deverão conter até 3 páginas.

Os artigos devem ser encaminhados ao editor-chefe da revista, especificando a sua categoria.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E TRANSFERÊNCIA

DE DIREITOS AUTORAIS: Eu (nós), abaixo assinado(s) transfiro(erimos) todos os direitos autorais do artigo intitulado (título) à **Ciência, Pesquisa e Consciência** Revista de Medicina.

Declaro(amos) ainda que o trabalho é original e que não está sendo considerado para publicação em outra revista, quer seja no formato impresso ou eletrônico. Data e Assinatura(s).

Cada artigo deverá indicar o nome do autor responsável pela correspondência junto à Revista e seu respectivo endereço, incluindo telefone e e-mail, e a este autor será enviado um exemplar da revista.

ASPECTOS ÉTICOS: todas as pesquisas envolvendo estudos com seres humanos deverão estar de acordo com a Resolução CNS-196/96, devendo constar o consentimento por escrito do sujeito e a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Caso a pesquisa não envolva humanos, especificar no ofício encaminhado. Deverá ser enviada cópia do Parecer do CEP. Quando relatam experimentos com animais, os autores devem mencionar se foram seguidas as diretrizes institucionais e nacionais para os cuidados e a utilização dos animais de laboratório.

ENVIO DE ORIGINAL: ao Editor Chefe responsável pela **Ciência, Pesquisa e Consciência** Revista de Medicina. O artigo deve ser enviado pelo endereço eletrônico (e-mail: revistamedicina@fipa.com.br) digitado no programa Microsoft Office Word da versão 2003 ou 2007. Recomenda-se que os autores retenham uma cópia do artigo. Após o recebimento do

material será enviado e-mail de confirmação ao autor responsável.

SELEÇÃO DOS ARTIGOS: inicialmente, todo artigo submetido à Revista será apreciado pelo Conselho Científico nos seus aspectos gerais, normativos e sua qualidade científica. Ao ser aprovado, o artigo será encaminhado para avaliação de dois revisores do Conselho Científico com reconhecida competência no assunto abordado. Caso os pareceres sejam divergentes o artigo será encaminhado a um terceiro conselheiro para desempate (o Conselho Editorial pode, a seu critério, emitir o terceiro parecer). Os artigos aceitos ou sob restrições poderão ser devolvidos aos autores para correções ou adequação à normalização segundo as normas da Revista. Artigos não aceitos serão devolvidos aos autores, com o parecer do Conselho Editorial, sendo omitidos os nomes dos revisores. Aos artigos serão preservados a confidencialidade e sigilo, assim como, respeitados os princípios éticos.

PREPARAÇÃO DO ARTIGO

Formatação do Artigo: a formatação deverá obedecer às seguintes características: impressão e configuração em folha A4 (210 X 297 mm) com margem esquerda e superior de 3 cm e margem direita e inferior de 2 cm. Digitados em fonte "Times New Roman" tamanho 12, espaço 1,5 entrelinhas, com todas as páginas numeradas no canto superior direito. Devem ser redigidos em português. Se for necessário incluir depoimentos dos sujeitos, estes deverão ser em itálico, em letra tamanho 10, na sequência do texto. Citação "ipsis litteris" usar aspas na sequência do texto.

Autoria, Título e Subtítulo do Artigo: apresentar o título do trabalho (também em inglês) conciso e informativo, contendo o nome dos autores (no máximo 6). No rodapé, deverá constar a ordem em que devem aparecer os autores na publicação, a maior titulação acadêmica obtida, filiação institucional, onde o trabalho foi realizado (se foi subvencionado, indicar o tipo de auxílio e nome da agência financiadora) e o endereço eletrônico.

Resumo: deverá ser apresentado em português e inglês (Abstract). Deve vir após a folha de rosto, limitar-se ao máximo de 250 palavras e conter: objetivo do estudo, procedimentos básicos (seleção dos sujeitos, métodos de observação e análise, principais resultados e as conclusões). Redigir em parágrafo único, espaço simples, fonte 10, sem recuo de parágrafo.

Palavras-chave: devem aparecer abaixo do resumo, fonte

tamanho 10, conter no mínimo 3 e, no máximo, 6 termos que identifiquem o tema, limitando-se aos descritores recomendados no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e apresentados pela BIREME na forma trilingüe, disponível à página URL: <http://decs.bvs.br>. Apresentá-los em letra inicial maiúscula, separados por ponto. Ex: **Palavras-chave:** Genética. Coração fetal. Pesquisa fetal.

Tabelas: as tabelas (fonte 10) limitadas a cinco no conjunto, devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto, com a inicial do título em letra maiúscula e sem grifo, evitando-se traços internos horizontais ou verticais. Notas explicativas deverão ser colocadas no rodapé das tabelas. Seguir Normas de Apresentação Tabular do IBGE. Há uma diferença entre Quadro e Tabela. Nos quadros colocam-se as grades laterais e são usados para dados e informações de caráter qualitativo. Nas tabelas não se utilizam as grades laterais e são usadas para dados quantitativos.

Ilustrações: deverão usar as palavras designadas (fotografias, quadros, desenhos, gráficos, etc) e devem ser limitadas ao mínimo, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto, e inseridas o mais próximo da citação. As legendas devem ser claras, concisas e localizadas abaixo das ilustrações. Figuras que representem os mesmos dados que as tabelas não serão aceitas. Para utilização de ilustrações extraídas de outros estudos, já publicados, os autores devem solicitar a permissão, por escrito, para reprodução das mesmas. As autorizações devem ser enviadas junto ao material por ocasião da submissão. Figuras coloridas não serão publicadas.

As ilustrações, além de inseridas no texto, deverão ser enviadas juntamente com os artigos em uma pasta denominada figuras, no formato BMP ou TIF com resolução mínima de 300 DPI. A revista não se responsabilizará por eventual extravio durante o envio do material.

Abreviações/Nomenclatura: o uso de abreviações deve ser mínimo e utilizadas segundo a padronização da literatura. Indicar o termo por extenso, seguido da abreviatura entre parênteses, na primeira vez que aparecer no texto. Quando necessário, citar apenas a denominação química ou a designação científica do produto.

Citações no Texto: devem ser numeradas com algarismos arábicos sobrescritos, de acordo com a ordem de aparecimento

no texto. Quando o autor é novamente citado manter o identificador inicial. No caso de citação no final da frase, esta deverá vir antes do ponto final e no decorrer do texto, antes da vírgula. Exemplo 1: citações com numeração sequencial "...de acordo com vários estudos¹⁻⁹." – Exemplo 2: citações com números intercalados "...de acordo com vários estudos^{1,3,7-10,12}." Excepcionalmente pode ser empregado o nome do autor da referência como, por exemplo, no início de frases destacando sua importância.

Agradecimentos: deverão, quando necessário, ocupar um parágrafo separado antes das referências bibliográficas.

Referências: as referências devem estar numeradas consecutivamente na ordem que aparecem no texto pela primeira vez e de acordo com o "Estilo Vancouver" Requisitos Uniformes do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE). Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html ou também disponível em: <http://www.bu.ufsc.br/bsscm/vancouver.html> traduzido e adaptado por Maria Gorete M. Savi e Eliane Aparecida Neto.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

Devem ser citados até seis autores, acima deste número, citam-se apenas os seis primeiros autores seguidos de et al.

Livro

Baird SB, Mccorkle R, Grant M. Cancer nursing: a comprehensive textbook. Philadelphia: WB. Saunders; 1991.

Capítulo de livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.465-78.

Artigo de periódico com mais de 6 autores

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. Br J Cancer. 1996; 73:1006-12.

Artigo de periódico

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002 Jul 25;347(4):284-7.

Trabalho apresentado em congresso

Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editores. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2002.

Documentos jurídicos

Brasil. Lei No 7.498, de 25 de junho de 1986. Dispõe sobre a regulamentação do exercício da enfermagem e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 26 jun 1986. Seção 1, p.1.

Tese/Dissertação

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertação]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

Material eletrônico

Foley KM, Gelband H, editores. Improving palliative care for cancer [monografia na Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [acesso em 2002 Jul 9]. Disponível em: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

ENDEREÇO PARA ENCAMINHAMENTO DE ARTIGOS

AO EDITOR CHEFE



Secretaria das Faculdades Integradas Padre Albino - FIPA

Rua dos Estudantes, 225 - Parque Iracema
Catanduva - SP
CEP 15809-144

Contato: e-mail: revistamedicina@fipa.com.br

Tel.: (17) 3311-3228

Impressão:

RAMON NOBALDOS
GRÁFICA E EDITORA

E-mail: atendimento@nobaldos.com.br
Rua 7 de Setembro, 342 - PABX: (17) 3522-4453 - CATANDUVA - SP

