

ANGELA MARIA RODRIGUES GIFONI

**ESTUDO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM PACIENTES
HIV-POSITIVOS : DETERMINAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM
NOVO PARÂMETRO FARMACOLÓGICO**

**Dissertação de tese apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, para a
obtenção do título de Mestre.**

FC-00002674-9

**Fortaleza-CE
1996**

TESÉ
616.9492
G3882
1996

CC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. R517674	
23 / 10 / 96	

~~2301531~~

R517674

1. Demazabilidade
2. Testes de permeabilidade intestinal - AIDS
3. AIDS - enteropatia - AIDS
4. Testes

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Universitária ou na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da U.F.C.

Assinatura de Angela Maria Rodrigues Gifoni
ANGELA MARIA RODRIGUES GIFONI

Dissertação aprovada em 29 / 03 /1996

Assinatura de Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
**Dr. ALDO ÂNGELO MOREIRA LIMA
(ORIENTADOR)**

Assinatura de Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Dra. HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

Assinatura de Dr. Talapala Govindaswamy Naidu
Dr. TALAPALA GOVINDASWAMY NAIDU

FORTALEZA-CE

DEDICATÓRIA

**Aos pacientes portadores ou doentes de AIDS que participaram
desta pesquisa, sofridos, gentis e esperançosos de uma cura,
infelizmente, a maioria deles hoje já falecidos. Deus lhes abençoe!**

**Aos meus pais e filhos, pelo apoio, compreensão, carinho e
incentivo em todas as horas mais dificeis.**

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, pela presença constante em minha vida!

Ao meu esposo Gifoni, pelo que de melhor se pode encontrar num ser humano, e pela revisão ortográfica desta dissertação.

Ao meu orientador, Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, um amigo, pela paciência e confiança no meu trabalho, além de me suprir de esclarecimentos científicos e de recursos humanos, técnicos e materiais indispensáveis à execução desta tese.

Ao amigo e farmacêutico Domingos Barreto de Oliveira, pelo apoio na execução de vários testes bioquímicos com finalidade diagnóstica importante no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao amigo e farmacêutico Luis Alberto de Figueiredo, pelo apoio na preparação das soluções.

Ao Dr. Richard L. Guerrant, pelo apoio técnico imprescindível nas dosagens do material enviado ao Laboratório da Universidade de Virgínia - EUA.

Ao Dr. Yongde Bao e à Dra. Terezinha de Jesus Silva, por suas colaborações fundamentais nas dosagens técnicas cromatográficas realizadas no Departamento de Microbiologia da Universidade de Virgínia, EUA.

Ao Dr. Manassés Claudino Fonteles, pela gentileza, incentivo e interesse no desenrolar da pesquisa.

Às amigas Maria Jânia Teixeira, Maria do Carmo N. Pinho e Isabel L. Mc Auliffe por sua contribuição nos exames realizados no Laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

Ao Dr. Manuel Odorico de Moraes, Coordenador do Curso de Mestrado em Farmacologia, pelo incentivo permanente, fundamental para me manter motivada até o final do mesmo.

**Ao Dr. Raimundo Messias de Araújo Filho, pela ajuda
inestimável na elaboração dos gráficos e tabelas desta dissertação.**

**Ao Dr. César Lincoln Maia, pelo apoio incondicional na
confecção dos diapositivos e outras ilustrações computadorizadas.**

**A todos os professores do Curso de Mestrado em Farmacologia
que, direta ou indiretamente, contribuiram para a minha formação e
enriquecimento científico.**

**Aos meus colegas de Mestrado pela solidariedade,
amizade e colaboração científica demonstradas ao longo do curso.**

**Ao Amigo Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, sempre disponível
para facilitar a vida institucional e curricular dos mestrandos.**

**Ao Dr. Anastácio de Queiroz Sousa, pelo apoio decisivo do
início ao fim desta tese.**

À assistente social Maria do Livramento Fontenele e à enfermeira Maria Lúcia Duarte, funcionárias do Ambulatório de HIV do Hospital São José, por facilitarem o contacto inicial e o desenrolar dos trabalhos com os pacientes HIV-positivos.

Aos funcionários do Serviço de Esterilização do Hospital São José, pela gentileza e apoio na coleta de urina dos pacientes.

1. Local de Coleta de Feces	1
2. Síntese Experiencial	2
3. Consideração de Ética	3
4. Termo de Adesamento	4
5. Critérios de Inclusão	5
6. Critérios de Exclusão	6
7. Cronograma	7
8. Protocolo	8
9. Protocolo no Teste de Proficiência	9
10. Exames Patológicos	10
11. Pesquisa de Leucocitose	11
12. Pesquisa de Leucocitose Fecal Padrão de Resposta	12
13. Teste de Alfa-1-Antitripsina	13
14. Análise Cromatográfica - HPLC-PAD Aptidão e Ajuste Químico Coleta e Conservação das Amostras Equilíbrio	14
Preparação das Amostras	15
Condições Cromatográficas de Análise - HPLC-PAD	16
Ajuste e Calibração das Ajustes	17
15. Análise Estatística	18

RESULTADOS

16. HPLC-PAD	19
17. Validação do Teste no Detecção pelo HIV	20

ÍNDICE

RESUMO	1
SUMMARY	3
INTRODUÇÃO	5-52
1. Definição de Permeabilidade Intestinal	6
2. Testes de Permeabilidade : Histórico	8
3. AIDS e Enteropatia	30
OBJETIVOS	53-54
MATERIAIS E MÉTODOS	55-88
1. Local do Estudo - Hospital São José	56
2. Plano Experimental	59
3. Comissão de Ética	60
4. Termo de Assentimento	61
5. Critérios de Inclusão	61
6. Critérios de Exclusão	62
7. Cronograma	63
8. Protocolo	64
9. Protocolo do Teste de Permeabilidade	64
10. Exames Parasitológicos	66
11. Pesquisa de Leucócitos	67
12. Pesquisa de Lactoferrina Fecal Padrão de Reações	68
13. Pesquisa de Alfa-1-Antitripsina	70
14. Análise Cromatográfica : HPLC-PAD Açúcares e Agentes Químicos	71
Coleta e Manuseio das Amostras	77
Equipamento	78
Preparação das Amostras	79
Condições Cromatográficas da Análise : HPLC-PAD	80
Separação e Calibração dos Açúcares	81
15. Análise Estatística	82
	88
RESULTADOS	89-114
HPLC-PAD	93
Validação do Teste na Infecção pelo HIV	96

ÍNDICE

INTRODUÇÃO: Custo da Diagnóstico de HIV: padronização da excreção de Lactulose e Manitol para uso de precipitante em suco gástrico industrial	115-133
DISCUSSÃO	115-133
Teste de Validação do HPLC-PAD	121
CONCLUSÃO	134-135
REFERÊNCIAS	136-161
ANEXOS	162-165

FIGURA 4. Cromatograma de paciente do Grupo A (Controle) HIV-negativo com diarréia - (n = 15).

FIGURA 5. Cromatograma de paciente do Grupo B (Casos) HIV-positivo com diarréia - (n = 15).

FIGURA 6. Cromatograma de paciente do Grupo B (Casos) HIV-positivo com diarréia - (n = 15).

FIGURA 7. Perfil de excreção urinária dos açúcares Lactulose e Manitol em dois pacientes HIV-positivos, dividido pelo HIV (C. P. A. - com diarréia (n = 15) e sem diarréia (n = 15).

FIGURA 8. Histograma da taxa de excreção urinária de Lactulose e Manitol em pacientes HIV-positivos com e sem diarréia.

FIGURA 9. Taxa de excreção urinária de Manitol (%) em pacientes HIV-positivos com e sem diarréia (medias ± desvio-padrão).

FIGURA 10. Taxa de excreção urinária de Lactulose (%) em pacientes HIV-positivos, com e sem diarréia (medias ± desvio-padrão).

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Curva de Calibração da Alfa-1-Antitripsina: Comparação dos diâmetros dos anéis de precipitação com padrões conhecidos. 74
- FIGURA 2.** Curva de Calibração da Alfa-1-Antitripsina usando o semilog da densidade óptica em comparação com padrões conhecidos. 76
- FIGURA 3.** Cromatografia de paciente do Grupo A (Controle): HIV-positivo sem diarréia - (n = 01). 83
- FIGURA 4.** Cromatografia de paciente do Grupo A (Controle): HIV-positivo sem diarréia - (n = 25). 84
- FIGURA 5.** Cromatografia de paciente do Grupo B (Casos): HIV-positivo com diarréia - (n = 15). 85
- FIGURA 6.** Cromatografia de paciente do Grupo B (Casos): HIV-positivo com diarréia - (n = 35). 86
- FIGURA 7.** Perfil de excreção urinária dos açúcares Lactulose e Manitol em dois pacientes HIV-positivos, detectado pelo HPLC-PAD: com diarréia (n = 39) e sem diarréia (n = 32). 98
- FIGURA 8.** Histograma da taxa de excreção urinária de Lactulose/Manitol: pacientes HIV-positivos com e sem diarréia. 100
- FIGURA 9.** Taxa de excreção urinária de Manitol (%) em pacientes HIV-positivos com e sem diarréia (média \pm erro-padrão). 102
- FIGURA 10.** Taxa de excreção urinária de Lactulose (%) em pacientes HIV-positivos, com e sem diarréia (média \pm erro-padrão) 104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 11. Taxa de excreção Lactulose/Manitol (%) na urina de pacientes HIV-infetados com e sem diarréia (média \pm erro-padrão).

106

FIGURA 12. Taxa de excreção Lactulose/Manitol na urina de pacientes HIV-infetados com diarréia, considerando-se sua etiologia (média \pm erro-padrão).

108

FIGURA 13. Taxas de excreção urinária (%) de Lactulose, Manitol e da razão Lactulose/Manitol de pacientes HIV-positivos com e sem diarréia de acordo com a sua etiologia (média \pm erro-padrão).

110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características dos pacientes HIV-positivos estudados no HSJ-Fortaleza-CE, Brasil: Pesquisa de Protozoários e Helmintos.

91

TABELA 2. Tempos de retenção e quantidades mínimas integradas de 6 réplicas dos padrões (médias \pm desvios-padrões).

94

TABELA 3. Limites de detecção dos açúcares analisados por um sinal sonoro de nível 20, e o mínimo de concentração de açúcares na solução injetada a ser quantificado.

95

TABELA 4. Alfa-1-Antitripsina, leucócitos e lactoferrina fecal em pacientes HIV-infetados com e sem diarréia: Presença ou não de *Cryptosporidium Parvum* e *Microsporidium* no grupo com diarréia.

112

ESTUDO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM PACIENTES HIV-POSITIVOS: DETERMINAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM NOVO PARÂMETRO FARMACOLÓGICO

ANGELA MARIA RODRIGUES GIFONI - Tese de Mestrado - UFC- 1996

Dentre as muitas substâncias testadas em estudos de permeabilidade intestinal, o manitol e a lactulose despontaram como as mais importantes. Como a lactulose é absorvida entre as junções celulares e o manitol através das células epiteliais, a lesão mucosa resulta em aumento da absorção de lactulose, ao passo que o dano em áreas absorтивas compromete a permeação do manitol. A Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Amperométrica Pulsada (HPLC-PAD), surgiu como uma alternativa capaz de superar os problemas de dosagens complicadas e demoradas dos açúcares de prova, com os métodos enzimáticos e cromatográficos comuns, até então disponíveis. Dada a elevada incidência de distúrbios intestinais em pacientes acometidos de AIDS e, levando em conta ainda, a crescente propagação cosmopolita desta doença, decidimos estudar possíveis alterações da permeabilidade intestinal em pacientes HIV-positivos, usando esta técnica. Nossa estudo foi realizado prospectivamente no Hospital São José de Doenças Transmissíveis, Fortaleza-Ceará, Brasil, nos meses de maio a junho de 1994. Acompanhamos 40 pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida humana, divididos em dois grupos: A-controle - com 20 pacientes portadores de HIV, sem diarréia; e B-casos- contendo 20 pacientes portadores de HIV, apresentando diarréia crônica e/ou persistente. Os pacientes esvaziaram a bexiga sob jejum matinal, ingerindo a seguir 20 ml de uma solução contendo 4g de lactulose e 1g de manitol. Após coleta urinária por 5 horas, 20 ml foram retirados de cada amostra e mantidos a -20° C, até a quantificação dos açúcares de prova pelo HPLC-PAD. Demonstrou-se uma importante redução na taxa de excreção urinária (%) de manitol nos pacientes HIV-positivos com diarréia (média \pm erro-padrão: A - 12,18 \pm 1,33; B - 7,50 \pm

1,20), $p < 0,05$, mas não houve diferença entre os dois grupos quanto à taxa de excreção urinária (%) da lactulose (A- $0,57 \pm 0,08$; B- $0,83 \pm 0,18$), ao mesmo tempo em que a taxa de excreção (%) da razão Lactulose/Manitol na urina foi também significativa (A- $0,05 \pm 0,008$; B- $0,15 \pm 0,04$), $p < 0,05$, teste t de Student. Também foram colhidas amostras fecais para pesquisa de helmintos e protozoários, e para a identificação de leucócitos, lactoferrina e alfa-1-antitripsina. O *Cryptosporidium parvum* (26,3%; 5/19) foi o parasita oportunista mais encontrado no grupo com diarréia, alterando significativamente as taxas de excreção do manitol e da razão Lactulose/Manitol ($p < 0,05$), em relação aos pacientes sem diarréia. A detecção de um único caso de *Enterocytozoon bieneusi* (1/19; 5,3%), entretanto, não permitiu uma estimativa real da participação deste agente na gênese da diarréia ou como fator de alteração da permeabilidade intestinal. No grupo sem diarréia identificou-se um paciente apenas (1/13; 7,6%), com cistos de *Entamoeba histolytica*. A pesquisa de alfa-1-antitripsina não mostrou diferença nos grupos estudados (A- 1/13; B- 2/19), mas a presença de lactoferrina (A- 2/13; B- 9/19), $p < 0,05$; e a de leucócitos (A- 0/13; B- 10/19), $p < 0,01$, teste do qui-quadrado, foram significativamente altas nos pacientes HIV-positivos com diarréia. Concluimos, portanto, que há uma evidente alteração da permeabilidade intestinal nos pacientes com AIDS apresentando diarréia crônica, demonstrada pelo uso de sondas moleculares de manitol e lactulose através do método HPLC-PAD.

STUDY OF INTESTINAL PERMEABILITY IN HIV-POSITIVE PATIENTS: DETERMINATION AND APPLICATION OF NEW PHARMACOLOGICAL PARAMETER

ANGELA MARIA RODRIGUES GIFONI - Thesis of Master - UFC- 1996

Studies on changes in intestinal permeability using molecular sugar probes have been developed recently. Because of their special characteristics, mannitol and lactulose are the most important molecules for determining noninvasive intestinal lesions in various diseases: both are hydrophilic, lipophobic and both have very low affinity to the glicidic carrier system of intestinal cells and neither suffers metabolic modifications. As lactulose is absorbed between cell junctions and mannitol through the epithelial cells, mucosal lesion results in increased absorption of lactulose, as the changes in the mucosal absorption area compromises mannitol permeation. High performance liquid-chromatography with pulsed amperometric detection (HPLC-PAD) is an alternative to overcome all the major problems of complicated and very slow readings of probe sugars with the enzymatic and chromatographic methods available today. Due to high incidence of intestinal disturbances in patients with AIDS we decided to study possible alterations of intestinal permeability in positive-HIV patients by employing this technique. The research was done prospectively at Hospital São José in Fortaleza (state of Ceará, Brazil) between May and June 1994. We have followed forty patients with acquired human immunodeficiency syndrome divided in two groups: A- Control-with 20 HIV-positive patients without diarrhea; B- Cases-including 20 HIV-positive patients presenting a chronic or persistent diarrhea. Patients emptied their urinary bladder in the morning, after overnight fast, then took 20 ml of fresh water solution containing 4 g of lactulose and 1 g of mannitol. After five hours of urinary collection, 20 ml were withdrawn from each sample and kept at -20° C until lactulose and mannitol were quantified by HPLC-PAD, at the Laboratory of University of

Virginia. A significant reduction (average \pm standard error) was demonstrated in the urinary excretion rate (%) of mannitol in HIV-positive patients with diarrhea (12.18 ± 1.33 versus 7.50 ± 1.20 , $p < 0.05$), but there was no difference between the two groups in lactulose urinary excretion rate (0.57 ± 0.08 versus 0.83 ± 0.18), according to the Student t test. While the lactulose/mannitol urinary excretion ratio (%) was increased in HIV-positive patients with diarrhea compared to controls without diarrhea (0.05 ± 0.008 versus 0.15 ± 0.04 , $p < 0.05$). Student's t. Fecal specimens were collected for identification of parasites, leucocytes, lactoferrin and alfa-1-antitrypsin. *Cryptosporidium parvum* (26.3%; 5/19) was the most frequent opportunist parasite in the diarrhea group modifying the excretion rates of mannitol and lactulose/mannitol ($p < 0.05$), against patients without diarrhea. As only one case of *Microsporidium* (1/19, 5.3%) was detected, it was not possible to estimate the contribution of this agent to diarrhea or alterations in intestinal permeability. Alfa-1-antitrypsin elimination was similar in both experimental groups (A- 1/13; B- 2/19). However, the differences in lactoferrin (A- 2/13; B- 9/19; $p < 0.05$) and leucocytes (A- 0/13; B- 10/19; $p < 0.01$) were highly significant in the HIV-positive patients with diarrhea (chi-square test). These data suggest that there is a detectable and significant alteration of intestinal mucosal permeability in patients with AIDS presenting chronic or persistent diarrhea, demonstrated by the use of dual sugar probes, and determined by HPLC-PAD whose efficacy, viability and sensibility are well recognized.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. DEFINIÇÃO DE PERMEABILIDADE INTESTINAL

Define-se permeabilidade como um fluxo de solutos através de uma unidade de área de membrana num certo tempo, enquanto absorção é o fluxo de solutos num dado tempo, sem se levar em conta a área de membrana. A permeação, ou seja, a penetração, depende fundamentalmente do tamanho molecular da substância em questão, em relação ao poros hidrofílicos da membrana. Em outras palavras, a permeabilidade se refere à facilidade com que a superfície da mucosa intestinal pode ser penetrada por difusão sem intermediadores de constituintes específicos; enquanto, a permeação depende essencialmente do relacionamento estreito entre a substância em questão e os constituintes da membrana a ser cruzada. Embora a absorção possa ser aumentada ou diminuída com base na área absorptiva, a permeabilidade permanece inalterada. Estimativas da permeabilidade intestinal podem ser obtidas por medidas de permeação, representando a quantidade absorvida. Esta

quantidade é afetada por fatores tais como o gradiente de concentração, a superfície de mucosa envolvida e o tempo de exposição (Lifschitz, 1985).

A molécula de prova ideal para a permeabilidade intestinal na espécie humana deve ser inerte, hidrossolúvel e diminuir sua passagem através da mucosa com o aumento do tamanho molecular. Preferencialmente, deve seguir o padrão de cinética de primeira ordem, além de ser atóxica, não degradada por bactérias intestinais e não metabolizada após a absorção. É imprescindível que os testes sejam de alta sensibilidade, precisão e acurácia, bem como facilmente exequíveis nos fluidos biológicos, como a urina, por exemplo.

2. TESTES DE PERMEABILIDADE : HISTÓRICO

Diferentes testes moleculares têm sido empregados para medir a permeabilidade intestinal: uréia (Fordtran e cols., 1965); xilose, lactulose, eritritol (Fordtran e cols., 1967); manitol, inulina, rafinose, ramnose, celobiose (Cobden e cols., 1980); polímeros de polietilenoglicol (Irving e cols., 1983); ácido úrico, creatinina, ácido etilenodiaminotetracético- (EDTA)⁵¹Cr (Bjarnason e Peters, 1983); e muitos outros, inclusive elementos de natureza proteica como α_1 -antitripsina (Crossley e Elliott, 1977); e lactoferrina (Elizabeth Silva, 1994).

A diferenciação entre modificações na permeação e na permeabilidade intestinal deve ser levada em conta. Um marcador de prova pode ser “diluído” na luz do intestino quando liberado numa solução hipertônica ou como resultado de doença. A diluição e, por extensão, o aumento do peristaltismo, podem resultar na exposição reduzida do marcador à superfície intestinal, o que poderia alterar a permeação e,

consequentemente, ocasionar concentrações urinárias diminuídas do marcador. A permeabilidade da mucosa, contudo, permaneceria normal. Retardo no esvaziamento gástrico, diluição intraluminal, aceleração do trânsito gastrintestinal, excreção renal comprometida ou degradação parcial por bactérias, são todos fatores capazes de alterar os testes de permeabilidade (Lifschitz, op. cit.).

Muitas são as patologias que se associam a alterações na permeabilidade intestinal, manifestando-se clinicamente por diarréia e perda de peso: doença celíaca (Pearson e cols., 1982), AIDS (Tanowitz e cols., 1992), doença de Crohn (Teahon e cols., 1992), enteropatia perdedora de proteínas associada com *Clostridium difficile* (Rybolt e cols., 1989); diarréia crônica e desnutrição (Lunn e cols., 1991); diarréia infecciosa (Silva, op. cit.) e como também indivíduos sadios comparados com portadores de doença celíaca (Menzies, 1974).

Estudos farmacológicos compreendendo principalmente a cinética de absorção de determinadas substâncias do intestino, têm sido utilizados em todo o mundo na tentativa de compreender e explicitar melhor toda a gama de modificações da mucosa digestiva, com suas respostas fisiopatológicas.

A identificação de proteínas eliminadas nas fezes tornou-se difícil por causa dos trabalhosos procedimentos diagnósticos usualmente empregados. Os primeiros métodos usados para a detecção de enteropatia perdedora de proteínas requeriam colecções diárias das fezes, após injeções intravenosas de polivinilpirrolidona marcada radioativamente ou de proteínas radioativas (Gordon, 1959; e Waldman, 1961).

A alfa-1-antitripsina, uma proteína sérica normalmente não encontrada no trato gastrintestinal, é medida em amostras simples de fezes, e a sua presença adotada como um marcador de enteropatia perdedora de proteína. Este método tem sido

considerado específico e de fácil execução (Bernier e cols., 1978; Quigley e cols., 1987).

Rybolt e cols. (op. cit.), demonstraram a presença de alfa-1-antitripsina em 12 (100%) pacientes com diagnóstico colonoscópico de colite pseudomembranosa por *Clostridium difficile*. Também identificaram alfa-1-antitripsina nas fezes de 06 dentre 14 (43%) pacientes com diarréia, portadores de *C. difficile* sem pseudomembranas; e em 50% (6/12) dos pacientes ambulatoriais com cultura positiva para *Clostridium difficile*, mas negativos para sua citotoxina; Todavia, não a encontraram em nenhum dentre 15 indivíduos sadios-controle.

Quan Ao analisar 72 amostras-controle e 168 amostras de crianças acometidas por diarréia aguda e/ou persistente, em Fortaleza-Ceará, Brasil, de 1988 a 1991, utilizando o teste de aglutinação em látex para detecção de lactoferrina como marcador de disfunção absortiva, Silva (1994, op. cit.) demonstrou a significante sensibilidade do método (0,74 contra

0,60 para pesquisa de leucócitos fecais), além de alta especificidade (0,88) e valor preditivo positivo de 0,93.

O emprego de *sondas moleculares* como “marcadores” da capacidade absorptiva do epitélio intestinal, fornece a base farmacológica da pesquisa científica na tentativa de esclarecer os possíveis fatores envolvidos, permitindo a partir daí, o surgimento de prováveis opções terapêuticas visando o controle e/ou a minimização destes distúrbios absorptivos.

A determinação da permeabilidade intestinal vem ganhando espaço como um procedimento seguro e permite aferir o grau de comprometimento da mucosa intestinal tanto em seres humanos quanto em animais inferiores. Na prática, métodos com esta finalidade se baseiam na capacidade de recuperação na urina de sondas moleculares diversas, administradas por via oral, levando-se em conta suas propriedades intrínsecas e a maior ou menor facilidade na execução da pesquisa.

O EDTA-⁵¹Cr preenche vários pré-requisitos como agente de prova ideal, por ser estável, quimicamente atóxico e biologicamente inativo, com a vantagem de ficar restrito ao espaço extracelular. Infelizmente, a limitação a trabalhos com materiais radioativos permanece nos dias de hoje, não só pelo aspecto financeiro, mas também pela própria dificuldade técnica de execução. Além disso, não está afastada a possibilidade de absorção colônica dessa substância (Elia e cols., 1987).

Outra molécula muito estudada para este fim é o polietilenoglicol. Por apresentar-se com diferentes pesos moleculares, possibilita estudos de alteração da permeabilidade intestinal simultaneamente a partículas de vários tamanhos. Entretanto, suas vias de passagem transmembrana ainda não estão bem esclarecidas, dificultando a interpretação e a análise dos resultados obtidos (Tagesson e Sjodhal, 1984).

Os testes duplos com açúcares representam um grande avanço na determinação de alterações da permeabilidade e do

próprio conhecimento da fisiologia absorptiva intestinal. É inquestionável que ensaios sobre permeabilidade intestinal baseados na absorção quantificada de dois açúcares de tamanhos diferentes, proporcionam maiores informações sobre os distúrbios gastrintestinais do que os obtidos com os testes simples, bem menos sensíveis.

Recentemente, o manitol e a lactulose têm-se firmado gradativamente no mundo científico como sondas moleculares de preferência por suas propriedades, pois além de hidrofílicos e lipofóbicos, apresentam afinidade desprezível pelo sistema transportador de glicídios da mucosa intestinal, sendo portanto passivamente absorvidos e com a vantagem, ainda, de não sofrerem metabolização (Laker e Menzies, 1977). Como são estruturas orgânicas de pesos moleculares diferentes, o manitol atravessa a célula através da parte hidrofílica da membrana, enquanto a lactulose passa pelos complexos nexos juncionais e zonas de extrusão dos espaços intervilosos. Assim, a perda da integridade da mucosa tem grande probabilidade de propiciar o

aumento da captação de lactulose, ao passo que a perda de áreas absorтивas compromete a absorção do manitol.

No ano de 1922, Folin e Bierglund (citados por Menzies, op. cit., 1974) alertavam para o fato de pequenas quantidades de lactose e sacarose da dieta passarem intactas através do intestino normal, provavelmente por um processo de difusão sem mediadores, sendo gradativamente excretadas na urina.

Os trabalhos pioneiros de Eegriwe (citado por Mac Fadyen, 1945) e o próprio Mac Fadyen (op. cit.), estabeleceram os pilares de sustentação para o aproveitamento do manitol como marcador celular da zona absorтивa.

Em 1947, Corcoran e Page propuseram, com sucesso, um método fundamentado nos anteriores para a determinação do manitol no plasma e na urina. Sabendo que o manitol é oxidado pelo ácido periódico à temperatura ambiente em solução ácida ou neutra, enquanto a oxidação de muitas outras substâncias,

incluindo a glicose, ocorre rapidamente apenas sob certas condições, estes autores desenvolveram um processo que consiste na estimativa colorimétrica do formaldeído produzido durante a oxidação controlada do manitol pelo ácido periódico.

A chave do sucesso deste método extremamente simples, consistiu na seleção criteriosa da concentração do ácido periódico necessário para oxidar o manitol, de forma a adaptar-se da melhor maneira possível às faixas de medidas fotocolorimétricas, permitindo discriminar, ou não se deixando influenciar, pela presença de outras substâncias oxidáveis, como a própria glicose, já que, teoricamente, qualquer substância oxidada pelo ácido em questão poderia interferir com a determinação.

Além da glicose, outros compostos tais como: frutose, alfa-glicerofosfato, etileno e propilenoglicol, com muita frequência costumavam até então interferir no processo, alterando a

produção de formaldeído ou levando a um excessivo consumo do ácido periódico.

Posteriormente, Moncrieff e Wilkinson em 1954 (citados por Menzies, 1974), demonstraram excreção urinária de lactose e sacarose em grandes quantidades, associada com gastroenterites infantis, doença celíaca, hérnia hiatal e outras patologias digestivas, atribuindo-se o fenômeno ao aumento da concentração intestinal desses açúcares, produzindo deficiência de dissacaridases ou uma elevação da permeabilidade por dano estrutural da mucosa. Tais experiências foram corroboradas por Gryboski e cols., em 1973.

Atualmente, a lactulose desponta como um dos mais importantes marcadores de prova da permeabilidade intestinal. Este dissacarídio sintético tem a grande vantagem de não ser hidrolisado pelas dissacaridases do intestino humano, nem metabolizado por outros tecidos, conforme demonstraram Dahlquist e Grybosky (1965). Deste modo, sua transferência

através da mucosa intestinal reflete de forma quantitativa e precisa a taxa de excreção urinária, após um período médio de cinco horas da ingestão.

Em 1969, Muller e cols. utilizaram a cromatografia em gás-líquido, método pioneiro para a época, visando avaliar o dano da mucosa intestinal, empregando a lactulose como marcador. Estranhamente, a excreção urinária da lactulose após a ingestão oral em pacientes com doença da mucosa intestinal não foi significativamente superior à dos indivíduos-controle.

Outros trabalhos como os de Pearson e cols. (op. cit.); e de Cobden (1978), destacaram de forma inequívoca que a permeabilidade da mucosa do intestino delgado à lactulose está significativamente aumentada em patologias como a doença celíaca e a de Crohn.

Ainda no ano de 1978, Menzies e cols. demonstraram que a medida criteriosa de açúcares é viável por cromatografia em

camada fina, no entanto, este procedimento, além de tecnicamente complicado, exibe limitações para concentrações muito reduzidas dos açúcares. No ano seguinte, o mesmo autor chamava a atenção para alterações da permeabilidade intestinal a açúcares na atrofia vilosa.

Por outro lado, também é flagrante a redução na absorção de monossacarídios como a xilose, manitol e ramnose. Este fato foi aproveitado por Hamilton e cols. (1982), quando consideraram e utilizaram a razão urinária dissacarídio/monossacarídio como um marcador dos mais sensíveis e úteis na detecção de patologias absorptivas intestinais, e igualmente até na monitorização da resposta terapêutica, como no caso específico de pacientes portadores de doença celíaca tratados com dieta livre de glúten.

No início dos anos 80, Laker publicou importantes trabalhos para dosagem de lactulose, manitol e ramnose, utilizando a

técnica de cromatografia gasosa, também de execução complicada.

A pedra angular do uso da lactulose para a função de marcador da permeabilidade intestinal tem sido a grande dificuldade decorrente da necessidade do emprego de técnicas altamente especializadas e complexas, como a cromatografia em gás-líquido. Um avanço neste campo de pesquisa surgiu em 1984, quando Behrens e cols. desenvolveram e publicaram um método revolucionário para a época que, por sua simplicidade e facilidade de execução, permitia a realização de ensaio quantitativo e ao mesmo tempo altamente sensível para a lactulose, com base em sua hidrólise enzimática.

Ford e cols. (1985), mediram a permeabilidade intestinal em crianças com diarréia aguda e crônica com base na absorção diferenciada de uma carga oral isotônica contendo uma mistura de lactulose, ramnose, d-xilose e lactose. Seus achados demonstraram que crianças com gastrite aguda sofrem

uma grande elevação na taxa de lactulose recuperada da urina. Após o tratamento adequado e a recuperação, os testes de permeabilidade também constatam a volta dos valores à normalidade. Já nas crianças acometidas de diarréia crônica, embora apresentem permeabilidade aumentada, os níveis não são tão significativos como os observados na gastrorenterite aguda. Estes dados sugerem, pela primeira vez na literatura, que o teste de permeabilidade intestinal pode ser utilizado como parâmetro farmacológico confiável para a avaliação da recuperação ou cura de problemas patológicos intestinais.

Maxton e cols., em 1986, notabilizaram-se publicando um trabalho empregando lactulose, EDTA-⁵¹Cr, L-ramnose e polietilenoglicol 500 como marcadores de prova da permeabilidade intestinal humana "in vivo". Como outros, estes autores achavam que a função da barreira intestinal seria da maior relevância para a etiologia e a patogênese de muitas doenças do trato digestivo. Embora o mecanismo preciso seja incerto, eles sugerem que a ruptura na função de barreira possa

permitir a permeação de antígenos luminais e predispor à doença, por mecanismos imunopatológicos. A questão é, de que maneira a permeação do PEG-400, l-ramnose, lactulose e EDTA-⁵¹Cr refletem a desagregação da barreira intestinal a estes elementos. Os estudos comparativos realizados por estes autores na doença de Crohn mostraram que a permeação da lactulose espelha a do EDTA-⁵¹Cr. A ramnose, contudo, permeia a mucosa intestinal de forma mais eficiente, comportando-se como a d-xilose na doença, implicando numa via de permeação diferente da utilizada pelo EDTA-⁵¹Cr e pela lactulose. Estes dados praticamente estabelecem e confirmam o princípio da excreção urinária diferencial de testes de prova administrados por via oral, como meios de medida específica da permeabilidade intestinal.

O PEG-400 tem sido aclamado como a molécula de prova ideal, mas está claro que ele não se adequa ao princípio da excreção urinária diferencial das substâncias-testes costumeiramente administradas por via oral. Seus vários

polímeros dividem-se numa via de permeação que é diferente e de muito maior capacidade do que a usada pela lactulose e pelo EDTA-⁵¹Cr. Embora se saiba que a eliminação urinária do PEG-400 após sua administração venosa é completa, a principal dificuldade tem sido explicar porque este marcador permeia a mucosa intestinal 50 a 100 vezes mais eficientemente do que a lactulose e o EDTA-⁵¹Cr, apesar de exibirem tamanho molecular e hidrossolubilidade semelhantes. O PEG-400 difere significativamente do padrão absorutivo da lactulose e do EDTA-⁵¹Cr, comportando-se muito mais como a ramnose e o manitol em resposta ao estresse fisiológico e à doença. A precisa correlação dessas vias fisiológicas, entretanto, permanece indefinida.

Uma interessante pesquisa realizada por Deitch em 1990, chamou a atenção para o aumento da permeabilidade intestinal em pacientes queimados na fase aguda do episódio, com base em evidências experimentais diretas e clínicas diretas e indiretas, do comprometimento da barreira mucosa do intestino nestas condições. O autor demonstrou uma absorção de

lactulose quatro vezes superior (223 ± 54 mmol) à do grupo controle sadio (58 ± 11 mmol; $p<0,02$). Ao contrário, não houve diferença na excreção do manitol entre os pacientes ($4,04 \pm 0,78$ mmol) quando comparados ao grupo controle ($3,45 \pm 0,48$ mmol), havendo ainda um incremento de três vezes na relação lactulose/manitol ($5,2$ vs. $1,7$; $p<0,05$), num estudo de quinze pacientes estáveis hemodinamicamente, apresentando queimaduras em mais de 20% da superfície corporal, utilizando respectivamente, as técnicas de espectrofotometria de massa para a lactulose e de dosagem enzimática de Corcoran e Page (1974) para o manitol.

Em estudo semelhante, Le Voyer e cols. (1992), acompanhando as duas primeiras semanas de evolução em vítimas de queimaduras, sugeriram uma relação direta entre susceptibilidade à infecção e alterações precoces na permeabilidade intestinal. Os autores avaliaram a permeabilidade intestinal de quinze pacientes, medindo a excreção urinária diferencial de lactulose e manitol

lactulose quatro vezes superior (223 ± 54 mmol) à do grupo controle sadio (58 ± 11 mmol; $p<0,02$). Ao contrário, não houve diferença na excreção do manitol entre os pacientes ($4,04 \pm 0,78$ mmol) quando comparados ao grupo controle ($3,45 \pm 0,48$ mmol), havendo ainda um incremento de três vezes na relação lactulose/manitol ($5,2$ vs. $1,7$; $p<0,05$), num estudo de quinze pacientes estáveis hemodinamicamente, apresentando queimaduras em mais de 20% da superfície corporal, utilizando respectivamente, as técnicas de espectrofotometria de massa para a lactulose e de dosagem enzimática de Corcoran e Page (1974) para o manitol.

Em estudo semelhante, Le Voyer e cols. (1992), acompanhando as duas primeiras semanas de evolução em vítimas de queimaduras, sugeriram uma relação direta entre susceptibilidade à infecção e alterações precoces na permeabilidade intestinal. Os autores avaliaram a permeabilidade intestinal de quinze pacientes, medindo a excreção urinária diferencial de lactulose e manitol

simultaneamente, por cromatografia em gás-líquido. A faixa etária e o tamanho da área queimada foram, respectivamente, $32,7 \pm 3,6$ anos e $53,3 \pm 5,1\%$ da superfície corporal total. Dez voluntários sadios também foram estudados. A razão da excreção lactulose/manitol foi de $0,159 \pm 0,017$ para os pacientes com queimaduras e de $0,017 \pm 0,003$ para o grupo controle ($p<0,01$). O aumento da razão não se correlacionou com o tamanho da queimadura ou os dias de doença. Os pacientes que desenvolveram infecção clínica importante durante os quatorze dias subsequentes às queimaduras, apresentaram valores da razão lactulose/manitol significativamente elevados em relação aos observados tanto no grupo controle, quanto naqueles que não desenvolveram infecção.

O ano de 1990 pontificou no desenvolvimento da pesquisa sobre permeabilidade intestinal devido ao trabalho notável de Fleming e cols., empregando método de determinação rápida e simultânea de lactulose e manitol na urina, através de cromatografia líquida de troca aniónica de alta pressão,

combinada com detecção amperométrica pulsada. Os métodos usualmente empregados nessas pesquisas incluiam a cromatografia em camada fina e a análise enzimática dos glicídios - técnicas mais demoradas, requerendo a separação prévia de mono e dissacarídios. Outra alternativa era a cromatografia gasosa, que também exigia a derivação prévia dos agentes. A nova técnica se revelou extremamente simples e rápida, com todos os açúcares quantificados em 15 minutos. Neste trabalho foram estudados 18 indivíduos saudáveis, que apresentaram uma percentagem média de excreção da lactulose de $0,33 \pm 0,04\%$ e de $11,88 \pm 0,84\%$ para o manitol, com uma razão média lactulose/manitol da ordem de $0,027 \pm 0,003$.

Em março de 1993, Blomquist e cols. estabeleceram clássica comparação entre os tipos mais comuns de sondas moleculares, empregando razões como lactulose/manitol e EDTA-⁵¹Cr/manitol. Nesta ocasião demonstraram a importância do manitol como marcador da permeabilidade transcelular

enquanto a lactulose e o EDTA-⁵¹Cr foram ratificados como marcadores da permeabilidade paracelular.

A recuperação na urina dessas substâncias de prova, sobretudo quando se expressa na forma de razão, é particularmente sensível, na opinião de Sorensen e cols. (1993), porque ela reflete os efeitos contrários da absorção diminuída de monossacarídos como o manitol, devido a uma redução da área absorptiva total por uma certa lesão patológica, enquanto revela o aumento da permeabilidade a grandes moléculas de dissacarídos tipo lactulose, consequente à abertura de passagens intercelulares. Outra grande vantagem do uso desta razão na mensuração destes distúrbios é que ela contribui para minimizar ou eliminar erros devidos a fatores alheios à mucosa, tais como velocidade de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e coleta urinária, que são afetados de modo semelhante por esta variável.

Ainda no ano de 1993, Willems, Cadranel e Jacobs empreenderam interessante pesquisa para estudo de anormalidades da mucosa intestinal, com o objetivo de testar a sensibilidade e a praticidade do uso da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) na detecção de alterações à passagem de manitol e lactulose. De acordo com estes autores, a maioria dos testes disponíveis para avaliação da função absorptiva tem pouca aplicabilidade prática, alguns tornando-se até proibitivos, devido a complexidade das técnicas usadas. Decidiram, então, comparar o resultado de seus testes de permeabilidade com os obtidos de biópsias intestinais em vinte pacientes pediátricos, tendo constatado que todas as crianças com biópsia intestinal anormal exibiram um baixo índice de recuperação do manitol, enquanto os pacientes com história e sintomas alérgicos para o trato digestivo apresentaram uma elevação considerável na recuperação urinária da lactulose.

Wyatt e cols. (1993) também estudaram a permeabilidade intestinal na doença de Crohn, empregando como índice a razão

lactulose/manitol, tendo concluído que o aumento da permeabilidade precede a recaída clínica nesta enfermidade, sendo portanto um eficiente indicador da doença subclínica.

Por sua vez, Roumen e cols., no mesmo ano de 1993, mensurando o grau de alteração na permeabilidade intestinal após trauma severo ou choque hemorrágico, demonstraram sua elevação independentemente de quaisquer processos infecciosos subseqüentes.

Interessante é que, nesse mesmo dia recontabilizando a doença e da identificação da infecção pelo HIV, uma patologia de diarréias associada com a homossexualidade chamada de "síndrome do intestino gay", já era uma entidade médica conhecida (Tanowitz e cols., 1982).

3. AIDS E ENTEROPATIA

De todas as doenças que repercutem na função intestinal, nenhuma entretanto causou tanto impacto sobre a comunidade científica internacional quanto a síndrome da imunodeficiência adquirida. O envolvimento gastrintestinal é muito comum no curso desta entidade nosológica (Weber, 1986). Disfagia e odinofagia são sintomas esofágicos freqüentes entre os portadores da enfermidade em questão (Rabeneck e cols., 1990).

Interessante é que, antes mesmo do reconhecimento desta doença e da identificação da infecção pelo HIV, uma patologia diarreica associada com a homossexualidade chamada de “síndrome do intestino gay”, já era uma entidade bastante conhecida (Tanowitz e cols., 1992).

No início dos anos 80, quando surgiram os primeiros relatos de casos de síndrome da imunodeficiência adquirida, de patogênese até então desconhecida, mereceu realce o trabalho de Kotler e cols.(1984), que pesquisaram a enteropatia associada a esta síndrome. Estes autores resolveram investigar, de forma pioneira, a estrutura e a função do trato gastrintestinal dos pacientes “assim rotulados”, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Center for Diseases Control, Atlanta, GA, USA, em 1982.

A literatura destacava os sintomas gastrintestinais comuns ao quadro. Em muitos pacientes, a diarréia e a perda de peso se faziam presentes ou mesmo se constituiam no problema clínico mais importante (Gottlieb e cols.,1983).

Em alguns casos, a diarréia parecia ser causada por um agente infeccioso, mas em outros não havia causa evidente. Para melhor explorar o desenrolar da síndrome, Kotler e cols. (1984), acompanharam doze homossexuais masculinos doentes,

utilizando como controle onze homossexuais masculinos sadios. Sete pacientes apresentavam diarréia e perda de peso. As culturas de fezes para patógenos entéricos foram surpreendentemente negativas em todos os pacientes. Exames específicos para *Cryptosporidium spp.* foram realizados em três pacientes e quatro do grupo controle e nenhum foi positivo. Víroses, entretanto, foram detectadas em nove dos doze pacientes imunodeficientes, com predomínio de Cytomegalovírus e *Herpes simplex*. O exame imunológico demonstrou linfopenia nos pacientes. A razão linfócitos T CD4/CD8 esteve sempre abaixo do normal em todos os pacientes e em sete indivíduos do grupo controle, mas mostrou-se significativamente menor nos pacientes (0,36 versus 1,10; $p<0,001$). Os pacientes tinham também menor número de linfócitos helper circulantes (126 contra 652 células/mm³; $p<0,001$) e linfócitos supressores/citotóxicos (262 versus 571 células/mm³; $p<0,01$) do que os homossexuais-controle. Já a concentração de imunoglobulina sérica não diferiu nos dois grupos. Todos os pacientes estavam desnutridos. Eles pesaram menos do que o

grupo controle, levando-se em conta o peso corporal ideal (80% contra 101%; $p<0,001$). A circunferência média do braço foi menor nos pacientes ($p<0,05$). A concentração da albumina sérica ($p<0,001$) e a capacidade de ligação do ferro total ($p<0,005$) também se mostraram reduzidas. A concentração de albumina sérica também foi menor nos pacientes com diarréia ($2,2 \pm 0,4$ g/dl) do que no grupo sem diarréia ($3,3 \pm 0,2$ g/dl, $p<0,05$); foi ainda, menor nos pacientes sem diarréia do que no grupo controle ($4,0 \pm 0,2$ g/dl, $p<0,01$).

No mesmo trabalho, os testes absortivos revelaram marcante redução na excreção urinária de xilose nos pacientes, após 5 horas (2,5 versus 7,0 g, $p<0,001$). Significativamente, esta taxa foi maior nos pacientes sem diarréia do que no grupo controle ($p<0,005$).

Os estudos histológicos apontaram anormalidades em todos os pacientes com diarréia submetidos à biópsia retal e/ou jejunal. As anormalidades jejuna incluiam atrofia vilosa parcial

com hiperplasia de criptas e aumento do número intraepitelial de linfócitos; as anormalidades retais compreendiam inclusões virais intranucleares, infiltração mastocitária da lâmina própria e degeneração focal próxima à base das criptas. Tais achados sugerem que um processo patológico específico ocorre na lâmina própria do intestino delgado e cólon, em muitos pacientes portadores da síndrome.

O potencial papel da desnutrição no curso clínico da entidade relatada não foi bem enfatizado. A carência proteico-calórica e a deficiência de nutrientes ou oligoelementos específicos como o zinco e a glutamina, parecem afetar consubstancialmente a imunidade celular. Entre outros déficits, Kotler e cols. (op. cit.) demonstraram uma depressão na contagem global de linfócitos T, CD4, CD8 e na secreção de IgA.

Em resumo, as observações feitas pelos autores sugerem que a desnutrição consequente a uma disfunção absorptiva intestinal é comum nos pacientes com a síndrome da

imunodeficiência adquirida , devendo-se atentar para o tratamento da desnutrição nestes pacientes. Um subgrupo de pacientes com a síndrome em questão, sofreu sério dano na mucosa intestinal, que parece não ter sido resultado de infecção específica. A reabilitação destes pacientes pode ser impossível a menos que sejam encontradas alternativas para a correção da lesão da mucosa.

Dentre os inúmeros parasitas envolvidos na etiologia da enteropatia da AIDS, o *Isospora belli* tem sido recentemente reconhecido como um importante protozoário oportunista em tais pacientes. Embora raramente provoque diarréia nos pacientes com a síndrome nos países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, DeHovitz e cols. demonstraram isosporíase em 15% (20 em 131) dos pacientes com AIDS no Haiti (1986). A infecção associou-se com diarréia crônica aquosa e perda de peso, sendo clinicamente indistinguível da doença causada por *Cryptosporidium spp.* Não houve diferença demográfica ou laboratorial entre os pacientes com AIDS e isosporíase, daqueles

com criptosporidiose e outras infecções oportunistas. Nem o *Isospora belli*, nem o *Cryptosporidium spp.* foram detectados nas amostras obtidas de 170 companheiros ou cônjuges sadios dos pacientes com AIDS. Em todos os pacientes com isosporíase, a diarréia cedeu dentro de dois dias do início do tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim por via oral. Houve recorrência do quadro diarreico em 47% dos pacientes, mas eles tornaram a responder ao esquema quimioterápico já citado.

numum das 14 pacientes soronegativas permaneceu

Um interessante estudo sobre diarréia persistente associada com infecção HIV em Kinshasa, Zaire, foi desenvolvido por Colebunders e cols. em 1987. Observando que 40% (98/243) dos pacientes internados no Mama Yemo Hospital com diagnóstico de síndrome da imunodeficiência adquirida, apresentavam-se com história de diarréia de pelo menos um mês de evolução, os autores resolveram determinar o valor preditivo da diarréia persistente na AIDS. Assim, 128 pacientes consecutivos admitidos naquele hospital com diarréia persistente, foram testados para a presença de anticorpos HIV.

Surpreendentemente, 107 (84%) revelaram-se positivos. O acompanhamento destes pacientes mostrou uma elevada incidência de: erupção cutânea papular pruriginosa ($p=0,02$); infecção genital por *Herpes* ($p=0,05$); história de *Herpes zoster* ($p=0,08$); e infecção por *Cryptosporidium spp.* ($p=0,006$), em comparação aos pacientes apresentando diarréia persistente, mas soronegativos para o HIV. Bactérias patogênicas entéricas foram encontradas em 5 (7%) de 76 pacientes soropositivos, e em nenhum dos 14 pacientes soronegativos pesquisados por coprocultura. Concluem os autores, que a diarréia persistente em adultos na África Central, permanece fortemente associada com a infecção pelo HIV, embora os mecanismos fisiopatológicos da diarréia continuem obscuros.

Num estudo de 1988, Laughon e cols. citavam o *Cryptosporidium spp.*, a toxina associada ao *Clostridium difficile* e a *Isospora belli*, como os agentes mais comumente isolados das fezes de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida apresentando diarréia.

Ainda em 1988, Smith e cols. Publicaram um importante trabalho sobre o assunto. Seus objetivos consistiam na determinação da frequência de infecção por microrganismos patogênicos intestinais, nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e diarréia, bem como em investigar se o tratamento adequado para os agentes etiológicos identificados melhoraria o quadro clínico dos doentes. Desenvolveram, então, um estudo prospectivo de amostras consecutivas no National Institutes of Health, USA, envolvendo 20 homossexuais masculinos com AIDS e diarréia, e 10 homossexuais masculinos com a doença, mas sem diarréia. Todos os pacientes submeteram-se a exames físicos completos, pesquisas seriadas nas fezes para bactérias, vírus, fungos e protozoários patogênicos, além de esofagogastroduodenoscopia e colonoscopia, visando a obtenção de fluido duodenal e tecido mucoso para a análise de patógenos entéricos e estudos histopatológicos relacionados.

Os 20 pacientes com AIDS e diarréia tiveram maior perda ponderal, menor número médio de linfócitos T helper-indutor (OKT-4) e maior incidência de infecções oportunistas, do que os pacientes sem diarréia. Um ou mais patógenos entéricos foram identificados em 17 (85%, $p<0,05$) dos pacientes com diarréia. Em apenas um paciente sem diarréia foi detectada a presença de um patógeno entérico. Entretanto, 19 pacientes com diarréia e todos sem diarréia, exibiram modificações histopatológicas compatíveis com inflamação crônica, nos espécimes de biópsias intestinais realizadas. Após o tratamento específico de acordo com o caso (*Cryptosporidium spp.*, *E. histolytica* e *Cytomegalovirus* foram os mais encontrados), 16 pacientes demonstraram evidente melhora microbiológica, histológica e clínica.

Um dado alentador para a condução satisfatória dos casos de diarréia em pacientes com AIDS no terceiro mundo e países em desenvolvimento, surgiu com o trabalho de Johanson e Sonnemberg (1990), em que compararam a eficácia e o custo de

diferentes estratégias de avaliação e terapêutica médica. Os autores definiram três alternativas: avaliação completa (incluindo cultura de fezes, pesquisa de ovos para helmintos e protozoários, hemocultura, esofagogastroduodenoscopia e biópsia, colonoscopia e biópsia); avaliação limitada (envolvendo coprocultura, exames de ovos, larvas de helmintos e protozoários e hemocultura); e avaliação mínima (somente a coprocultura e pesquisa de parasitas). Os pacientes sem diagnóstico específico foram tratados sintomaticamente com difenoxilato. Aqueles que não responderam ao tratamento sintomático inicial e os que apresentaram diarréia recorrente foram conduzidos de acordo com o esquema de avaliação completa. As taxas de remissão da diarréia foram 75,2%, 74,8% e 74,8% nos pacientes submetidos às avaliações completa, limitada e mínima, respectivamente. Os respectivos custos das três estratégias foram US\$ 5419, US\$ 1997 e US\$ 1700, por paciente em remissão.

Pode-se concluir, portanto, que a avaliação mínima em todos os pacientes é bastante eficaz, e a que melhor preenche os requisitos de uma relação custo-benefício satisfatória no manuseio destes pacientes, reservando-se a avaliação completa apenas para os que não responderem ao tratamento sintomático e/ou específico.

Um outro trabalho de Kotler e cols. (1990), destaca uma lesão intestinal de pequena monta em pacientes portadores de doenças parasitárias e AIDS. Eles examinaram biópsias jejunais de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, diarréia crônica e perda de peso, correlacionando possíveis lesões intestinais com agentes patogênicos, modificações histopatológicas e distúrbios absorтивos. Acompanharam assim, prospectivamente, 43 pacientes com AIDS, 10 pacientes com complexos AIDS-relacionados e 06 controles voluntários heterossexuais. As biópsias jejunais em 62% dos pacientes com AIDS revelaram atrofia vilosa parcial, com ou sem hiperplasia de criptas, ao contrário do grupo controle, demonstrando uma

pequena lesão intestinal ($p<0,05$). Tal lesão associava-se a uma infiltração linfoplasmocitária no epitélio viloso ($p<0,05$). A microscopia eletrônica detectou *Cryptosporidium spp.* ou *Microsporidia* em 19 dos 27 pacientes com lesão mucosa intestinal. As consequências estruturais e funcionais deste parasitismo foram cruzadas com o estudo de 24 pacientes sem parasitas. Os pacientes parasitados tinham atrofia vilosa ($p<0,02$) e hiperplasia de criptas, ao contrário dos não parasitados. Os pacientes com parasitas apresentaram contagem linfocitária intraepitelial bem mais elevada ($p<0,05$) e absorção bastante reduzida de d-xilose ($p<0,01$) do que aqueles sem parasitismo. Concluiram os autores que a presença de criptosporidiose ou microsporidiose estava intimamente relacionada com a lesão e consequente disfunção intestinal, ainda que discreta.

Greenson e cols. (1991), também investigaram modificações morfológicas provocadas por infecções entéricas ocultas, produzidas em pacientes com síndrome da

imunodeficiência adquirida humana avançada e diarréia crônica de causa desconhecida. Estes autores compararam 22 pacientes (19 com AIDS e 03 com complexos AIDS-relacionados) apresentando diarréia crônica com avaliação prévia negativa para enteropatógenos, com 13 pacientes (09 com AIDS e 04 com complexos AIDS-relacionados) sem diarréia, mediante estudo de biópsias endoscópicas usando microscopia óptica e eletrônica, cultura para vírus e estudos morfométricos. Ambos os grupos foram seguidos por sete meses. Em 11 dos 22 pacientes com infecção pelo HIV e diarréia crônica e somente em um dos treze pacientes sem diarréia, detectou-se a existência de patógenos ocultos, após extensiva e criteriosa investigação de biópsias duodenais e cólon-retais. *Mycobacterium avis-intracellulare* e *Microsporidia* foram os agentes mais comumente encontrados (05 cada). Os pacientes com diarréia e infecção entérica oculta tiveram maior perda de peso (média de 14,3 Kg contra 6,2 Kg; $p<0,05$) e menor período de sobrevivência (01 em 11 comparados com 08 em 11 ainda vivos; $p<0,04$) do que aqueles com diarréia,

mas sem patógenos identificados, definidos como verdadeiros portadores da “enteropatia da AIDS”. A morfometria duodenal demonstrou um nítido decréscimo da razão vilosidades/criptas devido à atrofia vilosa e ao alongamento das criptas nos pacientes infectados pelo HIV com e sem diarréia, quando comparados com o grupo controle normal ($p<0,001$).

Os autores, portanto, concluem que o seguimento mediante endoscopia e biópsia de pacientes com AIDS que inexplicavelmente exibem diarréia crônica, demonstra infecção oculta em metade dos casos. Todavia, as alterações vilosas e na arquitetura das criptas na infecção avançada pelo HIV, mostrou-se independente da presença de diarréia ou enteroinfecção, não se correlacionando, porém, com a “enteropatia da AIDS”. A proliferação epitelial subnormal em resposta à lesão pode ser um fator, mas as causas subjacentes das mudanças arquiteturais permanecem indefinidas. Aliás, os autores sugerem que uma possível disfunção nos linfócitos T possa ter um papel relevante no processo.

Em 1992, Ehrenpreis e cols. publicaram notável artigo confirmando uma síndrome disabsortiva da d-xilose em portadores de AIDS com e sem diarréia. Tanowitz e cols., no mesmo ano, sugeriram muitas causas infecciosas, e outras não, como responsáveis pela diarréia destes pacientes.

A diarréia crônica é, portanto, uma das peças-chaves da AIDS. Os sintomas desta complicaçāo são preocupantes, conferindo um impacto contundente à qualidade de vida dos pacientes, podendo em casos severos levar a extremas anormalidades no balanço de fluidos e eletrólitos e, até mesmo, provocar a morte. O acompanhamento clínico ou quimioterápico da diarréia associada a esta doença é geralmente frustrante (Bartlett, Belitsos e Sears, 1992).

No mesmo ano, Lim e cols. fazendo um estudo comparativo da função e permeabilidade intestinal entre doença celíaca e AIDS, constataram significativa anormalidade em ambas as

doenças, quanto à taxa de excreção urinária de L-ramnose, d-xilose e 3-O-metil-glicose.

Em 1993, Blanshard e cols. realizaram estudo de microscopia eletrônica de biópsias retais em indivíduos HIV positivos, constatando anormalidades na maioria dos sintomáticos, incluindo a presença de estruturas túbulo-reticulares, perda de microvilosidades, edema e desagregação de nervos autonômicos. Alterações neuronais foram particularmente comuns nos pacientes com criptosporidiose. Segundo Chacin-Bonilla e cols. (1993), este parasita é extremamente comum nos pacientes portadores de HIV apresentando diarréia na localidade de Zulia State, na Venezuela. No mesmo ano, Brandonisio e cols. analisando as fezes de uma população constituída de 51 pacientes portadores do HIV com diarréia, identificaram o *Cryptosporidium spp.* em 33,3% dos casos.

A participação virótica na etiopatogenia da diarréia do paciente HIV positivo continua sem elementos palpáveis capazes de consubstanciar tal hipótese. A este respeito, merece menção o trabalho de Thea e cols., realizado em Kinshasa, no Zaire, em 1993. Na África, a diarréia é a manifestação mais comum da síndrome da imunodeficiência adquirida. Numerosos agentes bacterianos ou parasitas intestinais foram implicados, mas ainda não se detectou um agente etiológico específico. Tentando estabelecer uma correlação com viroses intestinais, os autores detectaram, através do teste ELISA ou pela microscopia eletrônica de amostras fecais, a presença de viroses entéricas (rotavirus, pequenas estruturas virais arredondadas, coronavírus e adenovírus) em 17% dentre 198 admissões consecutivas de adultos num hospital geral urbano de Kinshasa. Do total, 57% eram soropositivos para infecção pelo HIV. Destes, 50% foram classificados pelos critérios da Organização Mundial de Saúde como portadores de AIDS, estágio IV. A prevalência de viroses entéricas nas fezes não diferiu significativamente entre os pacientes com e sem infecção pelo HIV, e não teve associação

com diarréia aguda ou crônica, nem com sintomas constitucionais. Embora os autores não tenham encontrado quaisquer evidências, na população estudada, de suporte a algum papel patogênico de importância para estas viroses isoladas na “enteropatia da AIDS”, o aumento da carga viral mantém-se fracamente associada com a imunodeficiência.

Em 1994, Wuhib e cols. publicaram importante trabalho abordando a ocorrência de criptosporidiose e microsporidiose em pacientes infectados pelo HIV no nordeste brasileiro. Para determinar a frequência de parasitismo por patógenos intestinais na síndrome da imunodeficiência adquirida humana, os autores examinaram 295 amostras de fezes colhidas em 166 pacientes HIV positivos, dos quais 49% tinham AIDS manifesta, no Hospital São José de Doenças Transmissíveis, Fortaleza-Ceará, Brasil, de setembro de 1990 a março de 1992. Significativamente mais pacientes que apresentavam diarréia (85%), comparados aos que não apresentavam (66%), tinham AIDS ou complexos AIDS-relacionados ($p<0,05$). De todas as causas parasitárias

potenciais de diarréia, apenas as infecções por *Cryptosporidium parvum* e *Microsporidia* revelaram-se importantes. A criptosporidiose, mas não a microsporidiose, associou-se às estações chuvosas ($p<0,05$), fazendo crer que a água contaminada possa se constituir um fator preponderante na ocorrência da doença entérica. A fonte de contaminação da microsporidiose humana, no entanto, requer posteriores estudos.

Em 1995, Kotler e cols. decidiram determinar a prevalência de bactérias aderentes às células epiteliais intestinais, em espécimes histológicos de indivíduos infectados pelo HIV, e correlacionam a presença dessas bactérias com outras evidências de enteropatias. A prevalência foi determinada retrospectivamente a partir do exame do material de biópsia pelo período de um ano (1991), mantido sob congelação. A infecção foi localizada através da repetição dos exames em múltiplos sítios nos mesmos pacientes. Foram feitas correlações entre o achado de bactérias aderentes e vários parâmetros clínicos,

incluindo diarréia, perda de peso, contagem no sangue periférico de linfócitos CD4+, absorção de xilose e uso de antibióticos. Seus resultados demonstraram a presença de bactérias aderentes em 17% dos pacientes avaliados, num total de 66. A infecção localizou-se mais no ceco e cólon direito. Três padrões histopatológicos distintos de aderência foram observados: lesões obliterantes por agregação e empilhamento; bactérias intercaladas nas microvilosidades; e agregados bacterianos mais livremente aderidos ao epitélio danificado. As infecções se associaram à perda ponderal ($p<0,05$) e à contagem de células CD4+ no sangue periférico abaixo de $100/\text{mm}^3$ ($p<0,05$). Oito dentre nove pacientes tratados com antibióticos experimentaram melhora clínica sintomática. Culturas bacterianas de biópsias retais endoscópicas congeladas, resultaram na identificação de *E.coli* em 12 dentre 18 casos. O padrão de aderência agregativa foi visualizado em 06 dessas amostras. Os autores demonstraram, portanto, que um subgrupo de pacientes com AIDS tem infecção intestinal crônica com bactérias aderentes. A infecção se acompanhou de lesão, mal-absorção de nutrientes e

progressivo emagrecimento. Não está claro se a síndrome está relacionada a enteropatógenos clássicos ou a bactérias não patogênicas que se tornaram virulentas em virtude da imunodeficiência do hospedeiro. Se a vulnerabilidade para infecções crônicas com bactérias aderentes é uma decorrência do déficit imunológico, seu desenvolvimento é plenamente possível num paciente com AIDS. A infecção crônica com bactérias aderentes pode explicar a síndrome clínica idiopática da AIDS associada com o emagrecimento, ou a chamada "enteropatia da AIDS".

O termo enteropatia da síndrome da imunodeficiência adquirida é definido com amplas variações, como responsável por mudanças morfológicas e inflamatórias no trato gastrintestinal de pacientes com diarréia crônica e/ou persistente portadores do HIV, geralmente sem que sejam encontrados agentes etiopatogênicos responsáveis pelo processo. Se a ausência de parasitas é fruto da ineficácia dos

testes diagnósticos empregados ou da verdadeira inexistência de microrganismos parasitas, permanece uma incógnita.

Diante da persistência da dúvida se a diarréia é resultante de modificações fisiopatológicas provocadas na mucosa por conta dos inúmeros parasitas freqüentemente envolvidos e isolados ou por ação direta do próprio HIV; e objetivando reconhecer e identificar uma possível e precoce alteração na permeabilidade intestinal dos pacientes infectados, antes mesmo de apresentarem diarréia, tendo ou não relação com outros processos infecciosos e parasitários em geral, decidimos avaliar a função absortiva (permeabilidade intestinal) dos pacientes em acompanhamento ambulatorial ou sob regime de internamento no Hospital São José de Doenças Transmissíveis, na cidade de Fortaleza, num estudo prospectivo nos meses de maio a junho de 1994, na perspectiva de esclarecer melhor os passos fisiopatológicos envolvidos e de oferecer propostas alternativas para solucionar ou amenizar o problema.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1. Determinar através de análise direta a concentração dos açúcares manitol e lactulose em amostras de urina, mediante cromatografia líquida de alta pressão com troca de ânions, acoplada com detecção amperométrica pulsada.**

- 2. Analisar possíveis alterações da permeabilidade da mucosa intestinal em portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida humana apresentando diarréia crônica, através do uso de sondas moleculares de manitol e lactulose, em pacientes do Hospital São José de Doenças Transmissíveis.**

- 3. Validar o teste de permeabilidade empregando a razão lactulose/manitol (L/M) como parâmetro diagnóstico de lesão e/ou farmacológico de recuperação da capacidade funcional da mucosa intestinal.**

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. LOCAL DO ESTUDO - HOSPITAL SÃO JOSÉ

O Hospital São José de Doenças Transmissíveis Agudas é centro de referência, no estado do Ceará, para o tratamento de doenças infecciosas e transmissíveis em geral. Localizado no bairro Parquelândia, em Fortaleza, possui uma capacidade máxima para oitenta e cinco leitos, distribuídos segundo o sexo, em enfermarias apropriadas para os mais diversos tipos de patologias infecto-contagiosas, incluindo as viroses mais comuns da infância, como sarampo, rubéola, varicela e outras, além de enfermidades mais graves do tipo: hepatite, tétano, difteria, meningite, calazar e AIDS.

Na década de oitenta, Com o aparecimento dos primeiros casos da síndrome da imunodeficiência adquirida no estado do

Ceará, o Hospital São José logo notabilizou-se por ser durante vários anos a única unidade hospitalar do estado a prestar assistência a estes pacientes.

Sendo uma unidade avançada da Secretaria de Saúde do Estado, seu foco maior de atenção é constituído essencialmente de pacientes conveniados ao Sistema Único de Saúde - SUS. O trabalho ali desenvolvido, seja em regime ambulatorial, seja em casos de emergência ou através de internamento, se faz sempre sem qualquer ônus para o paciente, não importando sua procedência ou condição sócio-econômica.

Atualmente o hospital dispõe de um serviço especializado no atendimento a pessoas acometidas pela síndrome da imunodeficiência adquirida, abrangendo uma gama de profissionais treinados para lidar com esta clientela, numa rede multidisciplinar integrada, envolvendo médicos, enfermeiras, assistentes sociais, psicólogas, dentistas, além do pessoal de apoio técnico-administrativo.

Ao procurar o hospital o paciente é encaminhado ao ambulatório especializado de AIDS, onde após a abertura do prontuário é entrevistado por uma enfermeira do serviço de triagem. A seguir, é atendido pelo Departamento Médico para uma consulta inicial, fazendo então seus primeiros exames clínicos e laboratoriais. De acordo com a necessidade, em cada caso, pode ainda ser submetido a tratamento específico nas áreas de Odontologia, Psicologia, Assistência Social e Psiquiatria.

Os pacientes com bom estado geral permanecem sob tratamento por tempo indefinido neste ambulatório, com retornos mensais programados, podendo haver antecipação da consulta, levando-se em conta o interesse pessoal do paciente ou o surgimento de qualquer intercorrência clínica.

O hospital dispõe ainda de duas enfermarias para atendimento exclusivo aos portadores de HIV em estado mais grave, compreendendo um total de vinte leitos.

2. PLANO EXPERIMENTAL

Idealizamos um estudo prospectivo a ser realizado no Hospital São José de Doenças Transmissíveis Agudas da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, em colaboração com o Departamento de Fisiologia e Farmacologia e a Unidade de Pesquisas Clínicas, HUWC, CCS, da Universidade Federal do Ceará, compreendendo um total de quarenta pacientes, assim distribuídos:

GRUPO A - (Controle) Vinte portadores de HIV sem história de diarréia nos últimos quinze dias anteriores à entrevista.

GRUPO B - (Casos) Vinte pacientes portadores de HIV, com diarréia crônica ou persistente.

3. COMISSÃO DE ÉTICA

O protocolo experimental foi examinado e aprovado previamente pela Comissão de Ética do Hospital São José (Vide anexo nº 01).

Para todos os pacientes admitidos no estudo, anexou-se ao protocolo de pesquisa (anexo nº 02), a ficha de consentimento devidamente assinada pelo paciente e/ou responsável legal (anexo nº 03). Assegurou-se aos pacientes ou a seus responsáveis, o direito inquestionável de, a qualquer momento, retirarem-se espontaneamente do protocolo, sem prejuízo ou solução de continuidade em seu tratamento e assistência hospitalar, colocando-se sempre em primeiro lugar, o máximo controle possível da doença.

4. TERMO DE ASSENTIMENTO

Cada paciente, ou seu responsável legal, assinou voluntariamente o termo de permissão (anexo nº 03), para inclusão de seu nome na pesquisa, onde constam todas as etapas do trabalho de forma bem clara (de fácil assimilação por leigos), ficando estabelecido ainda o seu direito a livre acesso para a obtenção de todas as informações e esclarecimentos que julgar necessários, a qualquer época, ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Dada a dificuldade de coleta das amostras de urina nos pacientes do sexo feminino e nos internados, sobretudo quando restritos ao leito, incluímos na presente pesquisa somente indivíduos do sexo masculino acometidos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS.

Todos submeteram-se a tratamento ambulatorial ou sob regime de internamento nas enfermarias especializadas do Hospital São José.

Para efeito de composição dos grupos, consideramos diarréia a eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou pastosas em cada período de vinte e quatro horas, repetindo-se por mais de trinta dias seguidos nos casos crônicos, e durando de quinze a trinta dias seguidos nos casos persistentes, de acordo com a definição em boletim oficial da World Health Organization - WHO, 1988.

Foram excluídos todos os pacientes portadores de HIV comprovadamente acometidos de patologias sistêmicas graves concomitantes, como tuberculose, pneumonia, meningite, sepsis,

varicela, sarampo e outras, que impossibilitassem sua participação livre e voluntária (pacientes sob alimentação parenteral), além daqueles apresentando qualquer grau de insuficiência hepática, cardíaca e/ou renal.

7. CRONOGRAMA

A execução completa do programa foi prevista para o biênio 1994/1995, compreendendo as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento da hipótese e projeto de pesquisa (6 meses);
- b) Desenvolvimento do protocolo experimental e criação de uma rotina laboratorial para coleta (1 mês);
- c) Execução do projeto (3 meses);
- d) Realização completa dos testes laboratoriais (6 meses);
- e) Análise dos dados e redação da tese (6 meses).

8. PROTOCOLO

Para cada paciente admitido, consta um protocolo numerado (anexo n.º 02), com uma ficha individualizada, contendo dados pessoais e clínico-laboratoriais importantes referentes à evolução da doença, bem como um espaço destinado ao desenvolvimento da pesquisa propriamente dita (coleta e resultados).

9. PROTOCOLO DO TESTE DE PERMEABILIDADE

Depois de esvaziarem a bexiga, sob jejum matinal, os pacientes ingeriram vinte mililitros de uma solução preparada a fresco contendo 4 g de lactulose e 1 g de manitol em água potável. Uma hora após este procedimento, foram liberados para o desjejum. A urina foi coletada por cinco horas num recipiente próprio estéril, contendo 1 ml de chlorexidina a 20%. Uma vez estabelecida a diurese final do período, retirou-se uma alíquota de 20 ml de cada amostra, prontamente encaminhada ao

Laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, onde permaneceu mantida sob congelamento a -20°C até o seu envio para o laboratório especializado da Universidade de Virgínia, nos Estados Unidos da América. Ali se processou a dosagem dos açúcares na urina pelo método de cromatografia líquida de alta pressão, sob detecção amperométrica pulsada.

Concomitantemente, foram colhidas, em frascos adequados, amostras de fezes dos pacientes, visando a identificação de protozoários e helmintos, bem como para a dosagem de α_1 -antitripsina e lactoferrina. Este material foi encaminhado no prazo máximo de três horas ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará e mantido sob refrigeração para análise posterior.

10. EXAMES PARASITOLÓGICOS

Utilizamos o método de Ritchie modificado (Amato Neto, 1980), ou seja, a concentração pelo formol-éter: o éter age como solução excretora para gordura e detritos fecais, e o formol a 10% atua como antisséptico. O método tem como atributo principal a concentração de cistos de protozoários, larvas, ovos de helmintos (exceto os mais pesados) e tem sido efetivo para detectar *Enterocytozoon bieneusi*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp.*, *Isospora belli* e outros. Além disso, também fizemos uso da técnica de preparação de lâminas a fresco.

Para a identificação específica de *Cryptosporidium spp.* lançamos mão da técnica de coloração álcool-ácido, em que um esfregaço do material fecal é preparado em lâmina e corado com o corante primário carbol-fucsina, sendo em seguida descorado pela mistura álcool-ácido e contra-corado com azul de metileno. Como os oocistos de *Cryptosporidium spp.* são álcool-ácido

resistentes, se estiverem presentes, eles reterão a cor do corante primário, diferenciando-se assim do restante do material fecal, que manterá a coloração de fundo do contra-corante (Wuhib e cols., 1994, op. cit.).

A identificação de *Microsporidia* nas fezes se fez pelo método da reação em cadeia de polimerases com restrição de endonucleases, descrito por Fedorko e cols. (1995).

11. PESQUISA DE LEUCÓCITOS

Seguimos o procedimento tradicional: coloca-se uma gota de fezes sobre uma lâmina, adicionando-se uma gota de solução de azul de metileno a 1%. A preparação é homogeneizada, coberta com laminula e examinada ao microscópio óptico em objetivas de 40X. A amostra constituída de fezes formadas precisa ser previamente diluída com solução salina ou PBS, 1:1. Consideramos positiva a presença de mais de cinco leucócitos por campo.

12. PESQUISA DE LACTOFERRINA FECAL

As doenças diarreicas representam uma das maiores causas de morbidade no mundo, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Elas podem ser causadas por um número grande de patógenos, incluindo desde viroses (rotavírus, adenovírus) a bactérias (*E. coli* enterogênica, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Clostridium difficile* toxigênica) e parasitas (*Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia*). As diarréias são classificadas em inflamatórias e não inflamatórias. As não inflamatórias incluem as virose e muitas parasitoses e, geralmente, não têm a mesma gravidade das inflamatórias. As diarréias inflamatórias causadas por agentes microbianos como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* e *Cryptosporidium spp.* necessitam ser seguidas por estudos diagnósticos mais extensivos incluindo a realização de culturas (Guerrant e cols., 1990).

O método costumeiramente utilizado para a identificação de diarréias inflamatórias é o do azul de metileno acima descrito e baseado na detecção de leucócitos intactos nas fezes (Harris e cols., 1971). Em algumas circunstâncias (por exemplo, na diarréia em presença do *Clostridium difficile*), os leucócitos podem não permanecer intactos dificultando o diagnóstico do processo inflamatório. Os leucócitos fecais contêm lactoferrina e a liberam durante uma inflamação. Portanto, a lactoferrina serve como um marcador efetivo para a presença de leucócitos, intactos ou não. A lactoferrina é estável nas fezes e pode ser prontamente detectada por testes de aglutinação do látex (Guerrant e cols., 1992). Assim, usamos o “Fast ‘N’ Flammatory, método baseado na aglutinação do látex para a detecção da lactoferrina como substância marcadora de leucócitos fecais, desenvolvido por TechLab (Corporate Research Park, Blacksburg, VA, USA), e descrito por Okhuysen e cols. em 1992, enunciado a seguir:

Controle Positivo - a reação controle-positivo (mistura do látex sensibilizado com o reagente controle-positivo) apresenta

aglutinação de fácil visualização, com um halo claro ao redor.

Deve ser classificada no mínimo como 2^+ .

PADRÃO DE REAÇÕES

- = Ausência de aglutinação;

1^+ = Aglutinação fina, definida, com discreto halo leitoso;

2^+ = Aglutinação definida, iniciando a formação de um anel

branco no perímetro do líquido;

3^+ = Aglutinação mais forte, com anel claro mais

pronunciado;

4^+ = Aglutinação vigorosa, com anel bem evidente.

Controle Negativo - Não há aglutinação visível com a diluição de

1:50.

13. PESQUISA DE ALFA-1-ANTITRIPSINA

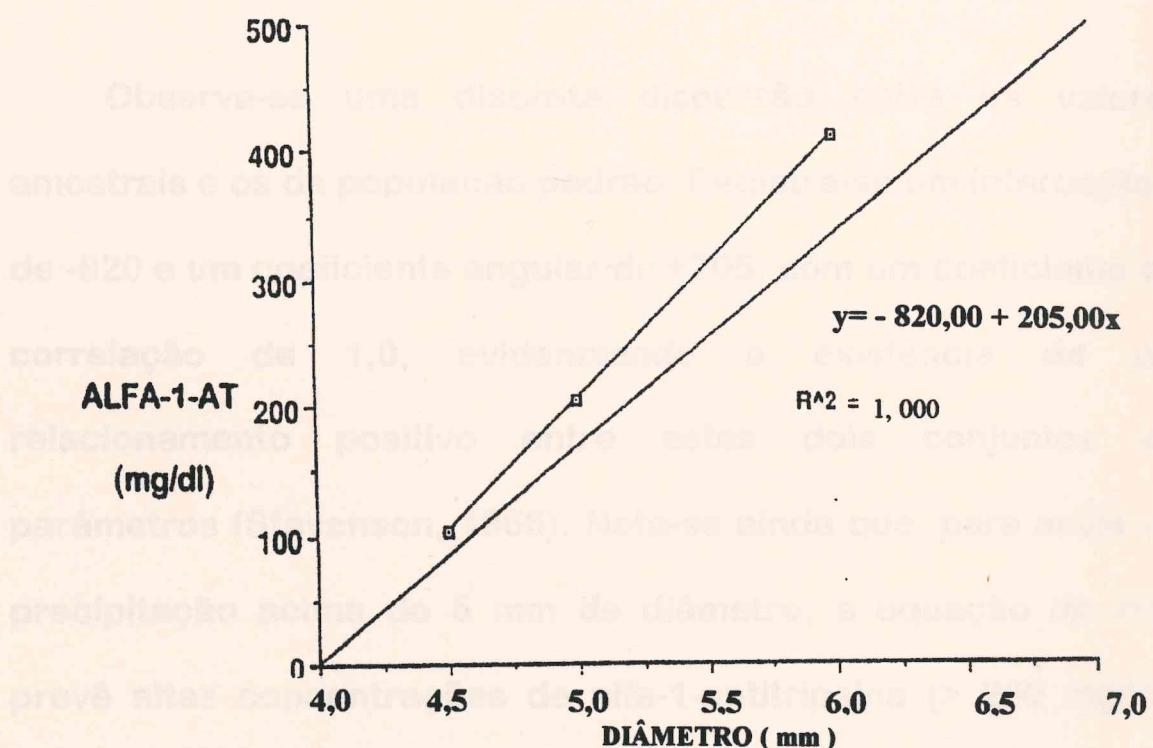
Para avaliação da perda proteica nas fezes, fizemos uso de um moderno método de radioimunodifusão em placas: NOR-Partigen Alfa -1 Antitrypsin Kit , distribuído pela Behring Diagnostics Inc., Somerville, New Jersey, USA, 1991. A técnica de imunodifusão radial simples foi desenvolvida para a quantificação de proteína no plasma e outros fluidos tissulares. No método originalmente descrito por Fahey e McKelvey (1965), os anticorpos da matriz -gel não estavam presentes em excesso, razão pela qual os pontos-finais da difusão não eram alcançados. Modificou-se a técnica de modo que os anticorpos na matriz-gel estejam presentes em excesso. No ponto-final, o diâmetro do anel de precipitação passa a exibir uma relação linear com as concentrações antigênicas. O método utilizado apresenta a vantagem adicional de leituras criteriosas após uma noite de incubação: cinco mililitros de uma amostra não diluída, ou a amostra reconstituída (aproximadamente 1 g de fezes para 1 ml de solução salina tamponada) dos pacientes com diarréia e do

grupo controle, foi aplicada em poços cilíndricos da matriz de gel contendo excesso de anticorpo monoespecífico contra alfa-1-antitripsina. Os抗ígenos colocados difundem-se radialmente, produzindo um anel de precipitação. Desde que o anticorpo na matriz-gel esteja presente em excesso sobre o抗ígeno, após o tempo necessário de incubação, um ponto-final é alcançado e o diâmetro do anel de precipitação permanece constante. Os resultados são quantificados por comparação de anéis padronizados obtidos com concentrações conhecidas com os anéis de precipitação produzidos nas amostras estudadas.

A elaboração da equação de regressão linear foi obtida a partir da comparação com os valores fornecidos pelo fabricante (47, 141, 282 e 416 mg/dl, respectivamente). Os diâmetros dos anéis de precipitação formados pelos padrões foram usados para definir a equação de regressão linear, a partir da qual as quantidades de alfa-1-antitripsina em cada teste foi calculada.

Rybolt e cols., 1989, demonstraram com a mesma técnica, que anéis de precipitação de 4 mm ou mais de diâmetro são formados pelos padrões e por concentrações crescentes de alfa-1-antitripsina nas fezes; e que anéis com diâmetros entre 3 e 5 mm podem não ser medidos acuradamente por conta da difusão, às vezes irregular, das faixas antigênicas. Estes autores, ao estudarem a eliminação fecal de alfa-1-antitripsina em portadores de colite membranosa por *Clostridium difficile* em comparação com indivíduos saudáveis (controles), estabeleceram o limite inferior de 65 mg/dl para a sensibilidade do teste, ou seja, todos os controles tinham nível de alfa-1-antitripsina abaixo desse valor, e os portadores de colite pseudomembranosa acusavam taxas gradativamente maiores e proporcionais aos anéis de precipitação, principalmente acima da faixa de 5 mm (V. Curvas-padrões - Figuras 1 e 2).

**Figura 1. Curva de Calibração da Alfa-1-Antitripsina:
Comparação dos diâmetros dos anéis de
precipitação com padrões conhecidos.**

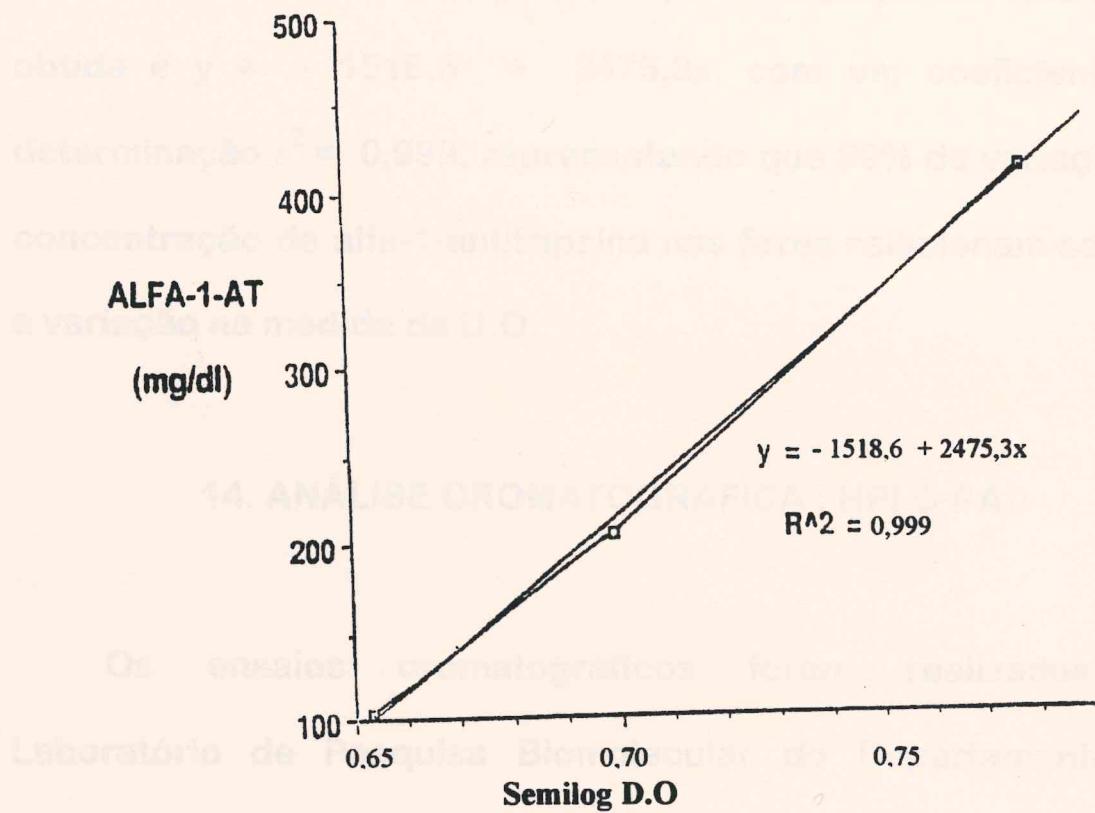


A figura 1 ilustra a determinação da equação da reta de regressão, tomando-se o diâmetro dos anéis de precipitação em mm como variável independente, e a concentração de alfa-1-antitripsina em mg/dl como variável dependente.

Observa-se uma discreta dispersão entre os valores amostrais e os da população padrão. Registra-se um intercepto-y de -820 e um coeficiente angular de +205, com um coeficiente de correlação de 1,0, evidenciando a existência de um relacionamento positivo entre estes dois conjuntos de parâmetros (Stevenson, 1986). Nota-se ainda que, para anéis de precipitação acima de 5 mm de diâmetro, a equação da reta prevê altas concentrações de alfa-1-antitripsina (> 200 mg/dl), sugerindo e caracterizando a enteropatia com perda de proteínas nas fezes.

A Figura 2 evidencia que a concentração da ALFA-1-AT pode ser obtida

Figura 2. Curva de Calibração da Alfa-1-Antitripsina usando o semilog da densidade óptica em comparação com padrões conhecidos.



A figura 2 evidencia que a conversão de uma das variáveis para a escala logarítmica fornece um modelo linear bem mais preciso e com menor dispersão. Aqui a variável independente utilizada foi o semilog da densidade óptica (D.O.) observada, e não o diâmetro do anel de precipitação. A equação da reta assim obtida é $y = -1518,6 + 2475,3x$, com um coeficiente de determinação $r^2 = 0,999$, representando que 99% da variação na concentração de alfa-1-antitripsina nas fezes relacionam-se com a variação na medida da D.O.

14. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA : HPLC-PAD

Os ensaios cromatográficos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Biomolecular do Departamento de Microbiologia da Universidade de Virgínia, EUA, sob a coordenação do Dr. Yongde Bao e equipe.

Clinicamente, a taxa de excreção lactulose/manitol na urina, após a administração desses açúcares, tem sido utilizada para

avaliar a extensão do comprometimento da mucosa intestinal em diversas doenças e situações de trauma. Numerosas técnicas foram registradas com o objetivo de determinar a razão lactulose/manitol, incluindo ensaios enzimáticos, cromatografia em gás-líquido, cromatografia em camada fina e cromatografia líquida de alta resolução.

AIDS Utilizamos a técnica de cromatografia líquida de alta resolução com troca aniónica, acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), a qual, requer uma preparação extremamente simples das amostras e evita basicamente, quaisquer interferências de outros elementos presentes na urina. *abre a análise posterior*

A) Açúcares e Agentes Químicos

Mioinositol, 3-o-metil-glicose, d-(+)-hidrocloreto de glucosamina, sorbitol, manitol, d-(+)-cellobiose, glicose, melibiose, lactulose e beta-lactose foram adquiridos dos

Laboratórios Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), para serem usados como padrões de análise. Hidróxido de sódio 50% (v/v), foi utilizado como eluente para o HPLC-PAD.

b) Coleta e Manuseio das Amostras

Amostras de urina do grupo controle e dos pacientes com AIDS foram coletadas por seis horas, após a administração de manitol e lactulose. O volume urinário total de cada indivíduo foi medido e registrado. A cada frasco coletor, administrhou-se 1 ml de clorohexidina a 20% (v/v) como antisséptico preservativo. Depois de vigorosa mistura, uma porção de 20 ml foi retirada e armazenada a -20°C até a análise posterior.

c) Equipamento

Utilizou-se um sistema analisador de carboidratos BioLC HPLC, composto com um módulo de bomba gradiente GPM-2, um módulo de gás eluente EDM-II e um detector PAD-II com

eletrodos de ouro, adquiridos todos junto à Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA. Também empregou-se um sistema CarboPac MA-1 de coluna de trocas aniónicas com coluna-guarda associada (250 mm x 40 mm i.d., pelicular), fornecido pela mesma companhia. A injeção automática foi assegurada por um processador de amostras inteligente Waters (WISP, modelo 710B, Waters, Milipore, MA, USA).

d) Preparação das Amostras

Uma alíquota de 50 μ l das amostras de urina armazenadas foi misturada com 3 ml de água deionizada contendo 60 μ mol/L de celobiose como padrão interno. Das amostras diluídas, uma alíquota de 200 μ l foi filtrada por meio de centrifugação através de membrana de acetato-celulose 0,22 μ M (Spin-X Centrifuge Filter Unit, Costar, Cambridge, MA).

e) Condições Cromatográficas da Análise : HPLC-PAD

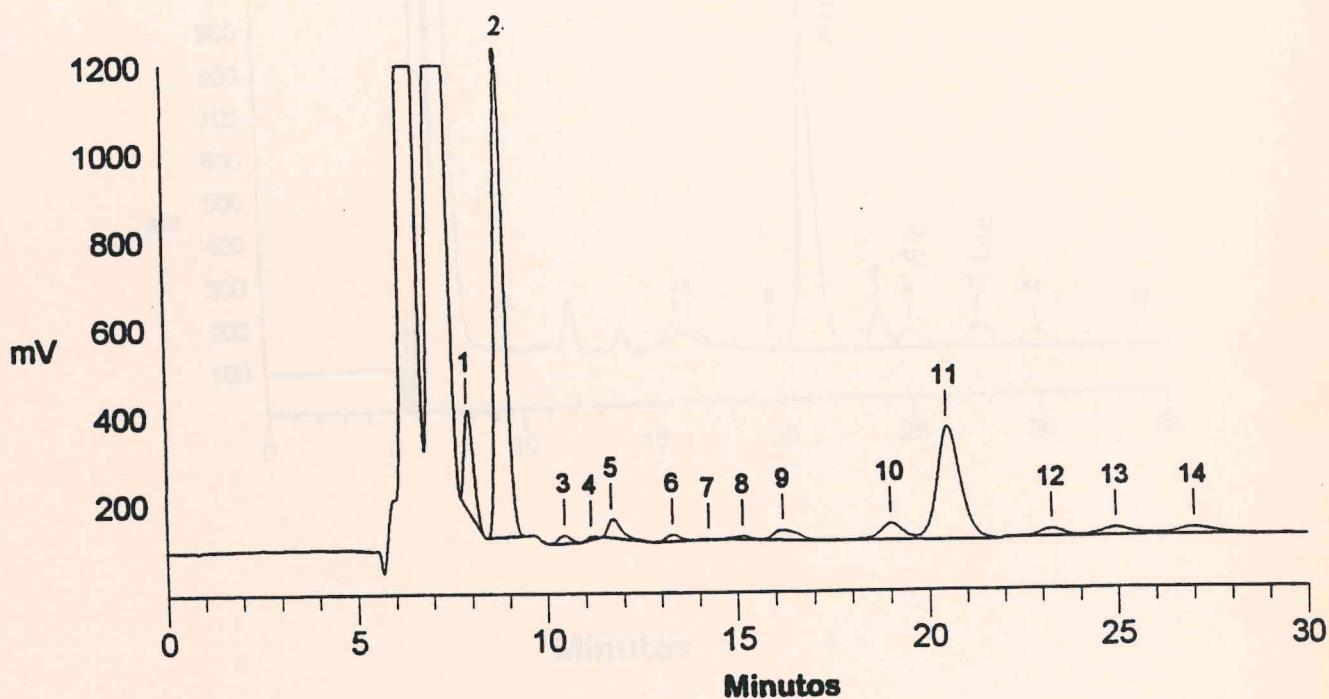
A cromatografia de trocas aniónicas de alta pressão dos álcoois-açúcares e dissacarídis foi realizada no sistema Dionex BioLC. A eluição dos álcoois-açúcares, monossacarídis e dissacarídis foi alcançada com o uso do eluente de NaOH 480 mM, a uma velocidade de fluxo de 0,4 ml/min. A coluna foi mantida em temperatura ambiental. A detecção foi conduzida com um detector amperométrico pulsado em forma de onda, com o seguinte perfil de duração de potencial: amostra - choque de 0,15 V, 720 mseg; oxidação - choque de 0,70 V, 120 mseg; redução - choque de 0,30 V, 360 mseg. O alcance de produção ou rendimento do detector foi estabelecido em 1,0 μ A com resposta de integração num tempo de três segundos. Foram injetados 50 μ l de cada amostra. A quantificação das análises foi feita pelo sistema de dados BioAutolon 450, que é uma parte do sistema Dionex.

As leituras foram feitas em duplicatas para todas as amostras, escolhendo-se o valor médio para os cálculos.

f) Separação e Calibração dos Açúcares

A coluna CarboPac MA-1 utilizada apresenta um pacote de resina em torno de uma base de coluna não metálica, sendo apropriada para a separação de substâncias fracamente ionizáveis em altas concentrações de hidróxido de sódio. Selecionamos, à guisa de ilustração, alguns exames cromatográficos para demonstrar o perfil típico da separação dos açúcares testados: inositol, 3-o-metil-glicose, melibiose, glucosamina, sorbitol, manitol, cellobiose, glicose, lactose e lactulose (Figuras 3 a 6).

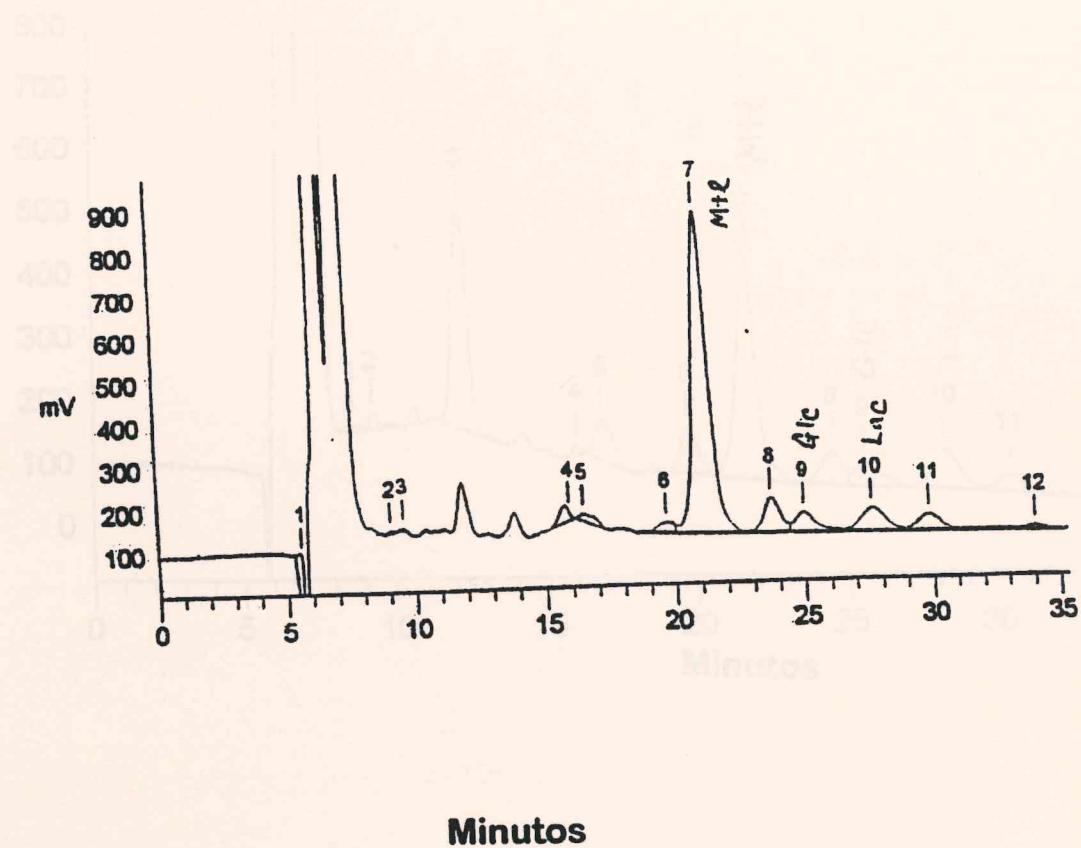
Figura 3. Cromatografia de paciente do grupo A (Controle): HIV-positivo sem diarréia - (n = 01)



Legenda
2- m-inositol
9- galactosamina
10- sorbitol
11- manitol
12- glicose
13- lactulose

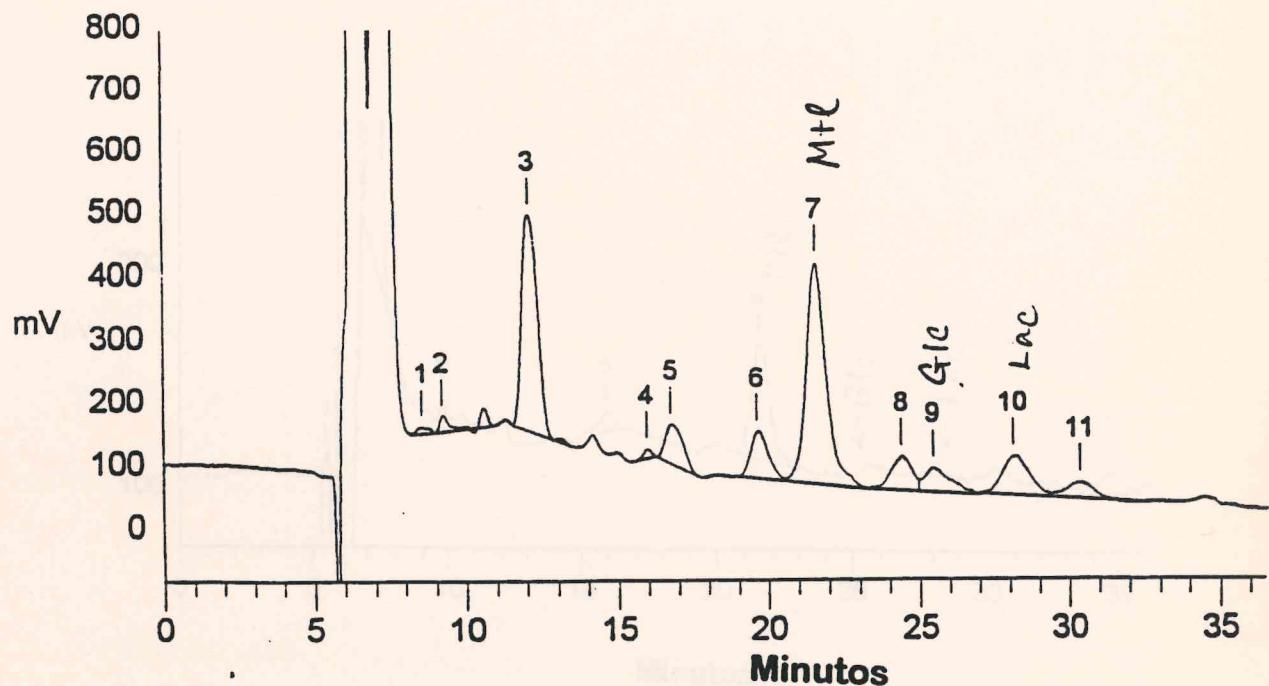
- 2- m-inositol
- 9- galactosamina
- 10- sorbitol
- 11- manitol
- 12- glicose
- 13- lactulose

**Figura 4. Cromatografia de paciente do grupo A (Controle):
HIV-positivo sem diarréia - (n =25)**



Legenda
 2- m-inositol
 5- galactosamina
 7- manitol
 9- glicose
 10- lactulose

**Figura 5. Cromatografia de paciente do grupo B (Casos):
HIV-positivo com diaréia - (n = 15)**

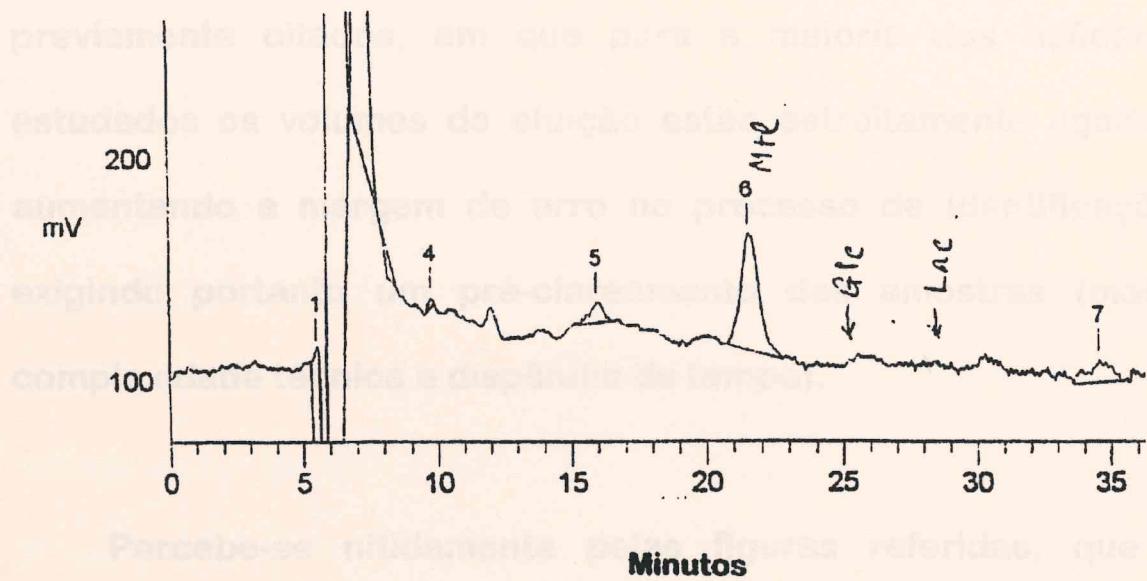


Legenda

- 2- m-inositol
- 4- galactosamina
- 7- manitol
- 9- glicose
- 10- lactulose

Figura 6. Cromatografia de paciente do grupo B (Casos):

HIV-positivo com diarréia - (n = 35)



Legenda
5- galactosamina
6- manitol
glc- glicose
lac- lactulose

Como se pode ver nos cromatogramas, o primeiro componente de interesse, isto é, o manitol, tem a sua eluição em volume bem distinto na coluna, tornando possível a sua identificação e minimizando a possibilidade de interferência. Este fato contrasta com a maioria dos métodos cromatográficos previamente citados, em que para a maioria dos açúcares estudados os volumes de eluição estão estreitamente ligados, aumentando a margem de erro no processo de identificação, exigindo portanto um pré-clareamento das amostras (maior complexidade técnica e dispêndio de tempo).

Percebe-se nitidamente pelas figuras referidas, que a coluna de identificação do manitol se inscreve no gráfico sistematicamente em torno de 21 minutos (tempo de retenção), estando separada da coluna representativa da lactulose por um intervalo de cerca de 6 a 7 minutos, não havendo, portanto, dificuldades maiores para o reconhecimento de ambos os açúcares.

Além disso, cada açúcar apresenta um tempo médio de retenção característico, com variações mínimas entre as amostras, reforçando a simplicidade e clareza na identificação inerentes à técnica do HPLC-PAD.

15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística se fêz pela aplicação do teste t de Student para dados paramétricos. O teste do qui-quadrado (ou sua variante - teste exato de Fisher) foi empregado quando da comparação de dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Na Tabela 1, pode-se observar os resultados obtidos no momento da coleta da população, quando já havia ocorrido o momento de descontágio, o qual não apresentou diferença estatística de tempo estabelecido para a coleta. Todas foram coletadas convenientemente.

RESULTADOS

Apresentam as condições de armazenamento e preparação adotadas no estudo portanto foi de 95% (40/43). Das 43 amostras permaneceram sólida e firme, não puderam ser avaliadas por exame da fezes. Apresentam um denúncio que não se coletaram. Por conseguinte, a coleta de fezes obteve uma eficiência de 90% (32/40).

Os dados da população analisada coletada na Tabela 2.

Os dados da população analisada coletada na Tabela 3.

RESULTADOS

Três pacientes saíram do estudo: dois desistiram no momento de iniciar a pesquisa, mesmo já tendo assinado o termo de consentimento; o outro não apresentou diurese no intervalo de tempo estabelecido para a coleta. Todos foram substituídos convenientemente por novos pacientes voluntários, que aceitaram as condições de admissão à pesquisa. A taxa de adesão ao estudo portanto foi de 93% (40/43). Dos pacientes que permaneceram até o final, oito não puderam fornecer material para exame de fezes. Apenas um destes queixava-se de diarréia. Por conseguinte, a coleta de fezes acusou uma eficiência de 80% (32/40).

Os dados da população estudada estão na Tabela 1.

TABELA 1. Características dos pacientes HIV-positivos estudados no HSJ - Fortaleza-Ceará -Brasil; Pesquisa de Protozoários e Helmintos.

	Grupo A Sem Diarréia (N=20)	Grupo B Com Diarréia (N=20)
Idade (Média + DP)	29 + 6,35	32,7 + 7,83
Faixa de Variação	11 - 42	20 - 53
Duração Média da Diarréia	-	123 dias
Faixa de Variação	-	15 -365 d
Desidratação		
Ausente	100%	40%
Moderada	-	60%
Severa	-	-
Peso (Média + DP)	54,8 + 12,60	50,4 + 6,86
Parasitas Isolados	(N=13)	(N=19)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0	26,3%
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	0	5,3%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0
<i>Giardia lamblia</i>	0	0
<i>Isospora belli</i>	0	0
<i>Entamoeba histolytica</i>	7,6%	0
Múltiplos	0	0

*p<0,05 vs. pacientes HIV-infectados sem diarréia (Teste exato de Fisher).

Consoante indica a Tabela 1, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo HIV-positivo com diarréia e o grupo controle, quanto à faixa etária e ao peso. Somente 01 paciente (5%) do grupo B apresentava diarréia com cerca de 15 dias de duração. A grande maioria (95%) queixava-se de diarréia crônica, com duração superior a trinta dias, chegando até a um ano de evolução. 60% dos pacientes com diarréia (12/20) encontravam-se moderadamente desidratados à admissão. Entre os parasitas pesquisados, predominou no grupo B (com diarréia) o *Cryptosporidium parvum* (26,3%, ou 05/19), ausente em todos os treze pacientes examinados do grupo A ($p<0,05$); Ainda neste grupo detectou-se a presença de cistos de *Enterocytozoon bieneusi* em um paciente (01/19; 5,3%). No grupo A foram encontrados cistos de *Entamoeba histolytica* em apenas um paciente (01/13; 7,6%).

HPLC-PAD

A determinação cromatográfica dos mono e polissacarídos foi grandemente reforçada com o advento da metodologia da cromatografia de trocas aniónicas de alta pressão, acoplada à detecção amperométrica ou eletroquímica pulsada.

A reproduibilidade da separação foi assegurada aplicando-se seis injeções idênticas (réplicas) de 3 nmol de cada padrão dos nove testados em 50 μ l de urina das amostras, e então comparando-se os tempos correspondentes de retenção e as quantidades medidas. O erro padrão para os tempos de retenção é menor do que 2,5%, enquanto que para a quantificação das amostras está abaixo de 3,5%. Os resultados são mostrados na tabela 2.

TABELA 2. Tempos de retenção e quantidades integradas de 6 réplicas dos padrões, juntamente com suas médias e desvios-padrões.

Açúcares	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	Repl. 6	M	DP

A. Tempos de Retenção (min)

m-Inositol	9,15	8,95	9,11	9,25	9,22	9,00	9,11	0,119
3-o-m-Glic	14,30	14,10	14,22	14,39	14,30	14,25	14,26	0,097
Glucosamina	16,00	15,75	16,05	16,12	16,10	16,05	16,01	0,135
Sorbitol	18,15	18,00	18,22	18,30	18,45	18,16	18,21	0,152
Manitol	21,53	21,35	21,58	21,75	21,90	21,80	21,65	0,202
Melibiose	23,15	23,08	23,15	23,26	23,22	23,06	23,15	0,077
Glicose	25,40	25,13	25,36	25,45	25,60	25,48	25,40	0,157
Lactulose	27,99	27,69	27,55	28,09	28,05	28,12	27,92	0,216
Lactose	30,33	30,21	31,00	30,42	30,50	30,25	30,45	0,289

B. Quantidades Integradas (pmol)

m-Inositol	3000	3018	3056	3033	2998	3155	3043	58,8
3-o-m-Glic	3000	3153	2897	3123	3086	3123	3064	97,3
Glucosamina	3000	3056	2866	3187	3048	3056	3036	103,9
Sorbitol	3000	2985	2989	3096	3102	3058	3038	53,9
Manitol	3000	2987	2879	3048	3052	3008	2996	62,9
Melibiose	3000	2899	2981	3107	2987	3018	2999	67,1
Glicose	3000	2969	3054	3025	3016	3089	3026	41,9
Lactulose	3000	3089	3102	3182	3113	3042	3088	62,5
Lactose	3000	3012	3058	3108	3123	3057	3060	49,4

A linearidade e os limites de detecção do HPLC-PAD também foram demonstrados (Tabela 3).

TABELA 3. Limites de detecção dos açúcares analisados por um sinal sonoro de nível 20, e o mínimo de concentração de açúcares na solução injetada a ser quantificada.

	Limites de detecção (pmol)	Conc. mínima (μ mol/L)
m-Inositol	05	0,10
3-O-m-Glicose	12	0,24
Glucosamina	12	0,24
Sorbitol	12	0,24
Manitol	08	0,16
Melibiose	12	0,24
Glicose	12	0,24
Lactulose	52	1,04
Lactose	47	0,94

Com este método o alcance de detecção foi mantido constante ao longo de todo o curso de separação. Contudo, a relação de linearidade manteve-se para concentrações de até 10 nmol por injeção em todos os padrões testados. Os limites de detecção são 8, 12, 47 e 52 pmol, respectivamente, para o

manitol, a glicose, a lactose e a lactulose. Os resultados obtidos foram: $y = 6,803x$ ($R^2 = 0,9998$, $DP = 0,114$), para o manitol; e $y = 4,731x$ ($R^2 = 0,9985$, $DP = 0,209$), para a lactulose.

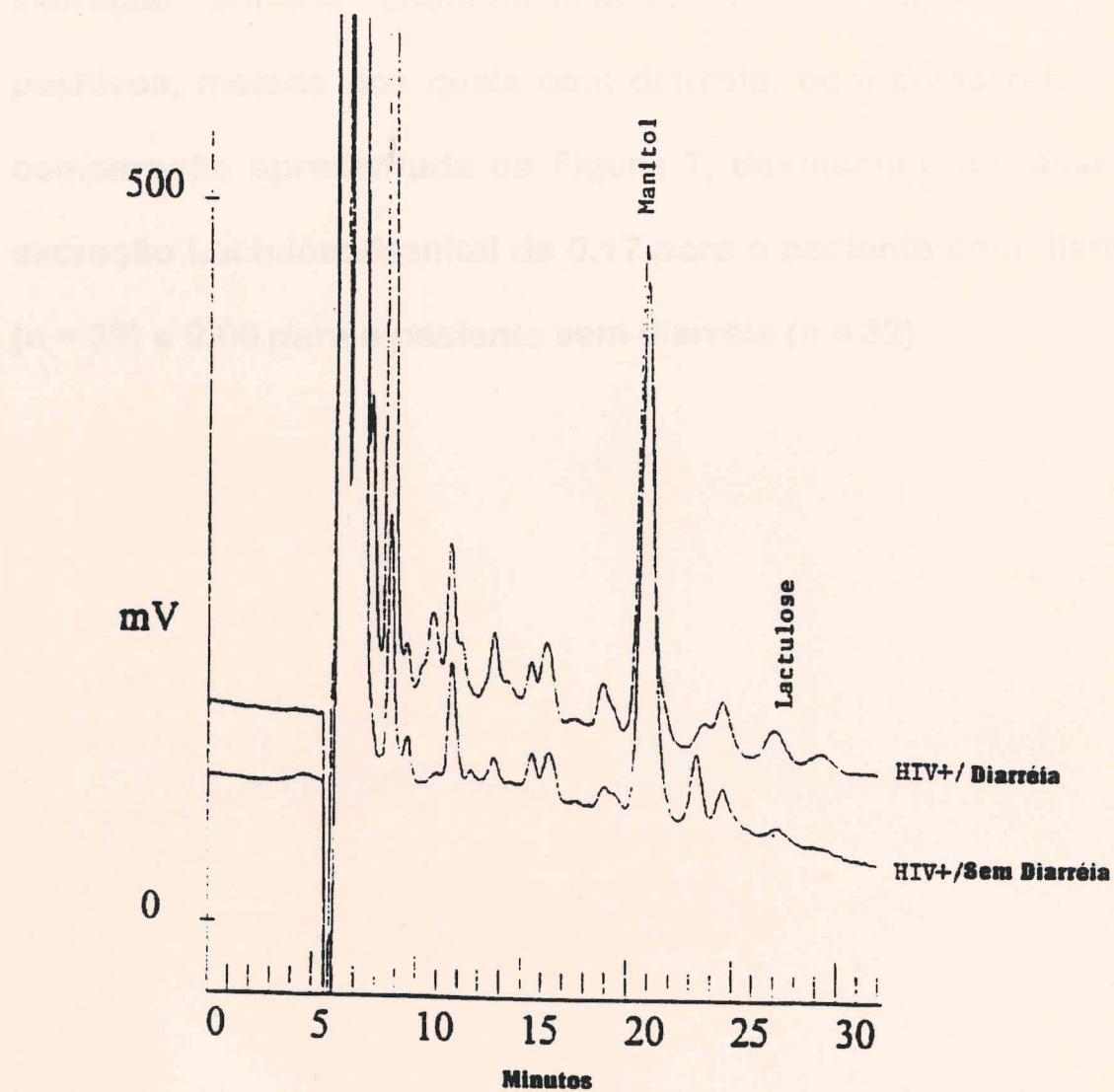
Validação do teste na infecção pelo HIV

A invasão pelo HIV provoca dano às junções celulares e assim compromete a integridade das membranas celulares. A membrana mucosa do trato gastrintestinal está entre os alvos mais susceptíveis aos vírus, tornando evidentes suas manifestações clínicas. A diarréia ocorre no paciente infectado à medida que o vírus se propaga. A razão da recuperação lactulose/manitol, um método não-invasivo convencionalmente utilizado como um indicador da permeabilidade gastrintestinal, é portanto, capaz de refletir a progressão da infecção intestinal pelo HIV.

A validação do teste foi feita no Laboratório da Universidade de Virgínia, Estados Unidos, sob a supervisão do Dr. Yongde Bao e equipe, a partir da administração da solução-teste a 38 pacientes HIV-infectados, metade dos quais apresentando diarréia.

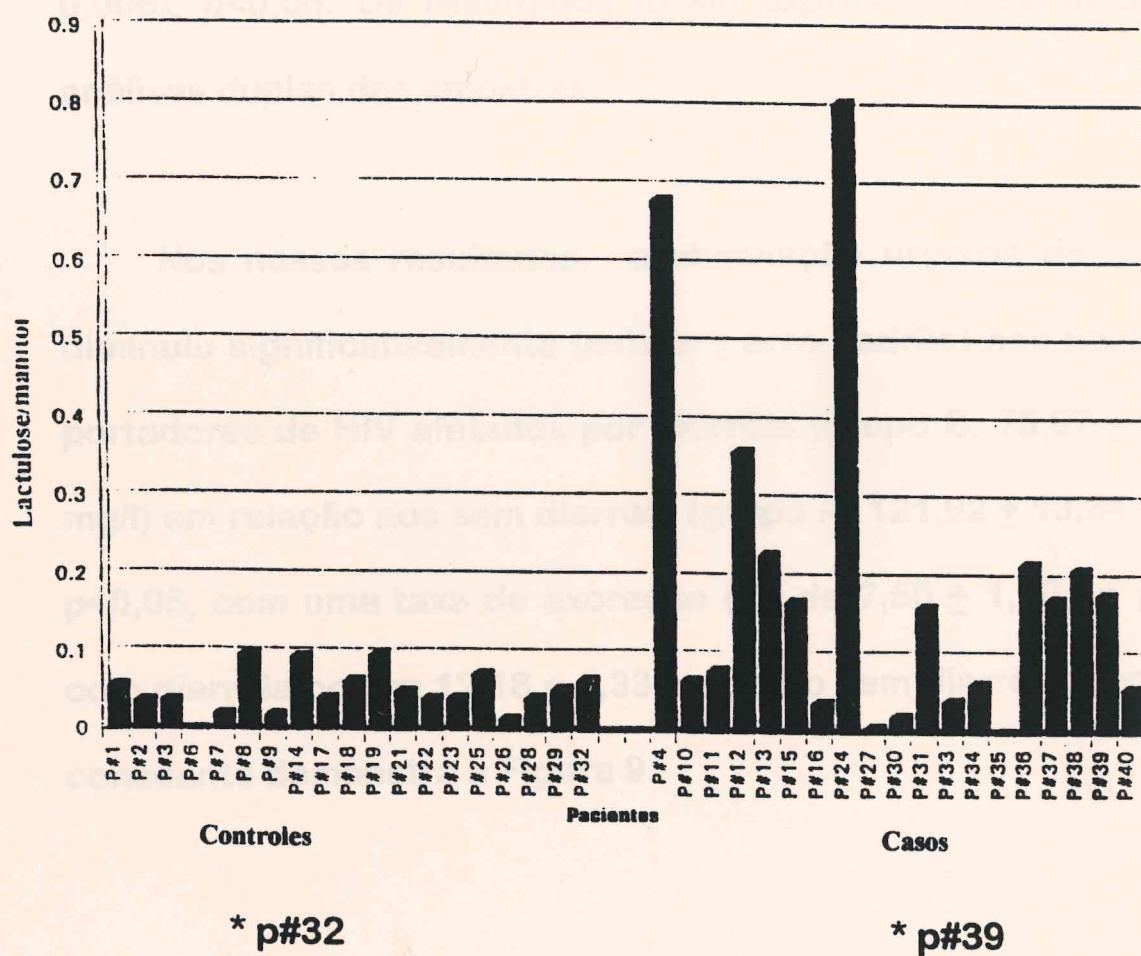
Cromatogramas de dois pacientes HIV-positivos com e sem diarréia ($n = 39$; e $n = 32$, respectivamente) são mostrados na Figura 7, como forma de ilustração da técnica, percebendo-se uma redução no pico do manitol e uma elevação no pico da lactulose no paciente com diarréia.

Figura 7. Perfil de excreção urinária dos açúcares Lactulose e Manitol em dois pacientes HIV-positivos detectado pelo HPLC-PAD: com diaréia (n = 39) e sem diarréia (n = 32).



O histograma da Figura 8 expressa a razão da taxa de excreção urinária Lactulose/Manitol em 38 pacientes HIV-positivos, metade dos quais com diarréia, bem como reforça a comparação apresentada na Figura 7, destacando as taxas de excreção Lactulose/Manitol de 0,17 para o paciente com diarréia ($n = 39$) e 0,06 para o paciente sem diarréia ($n = 32$).

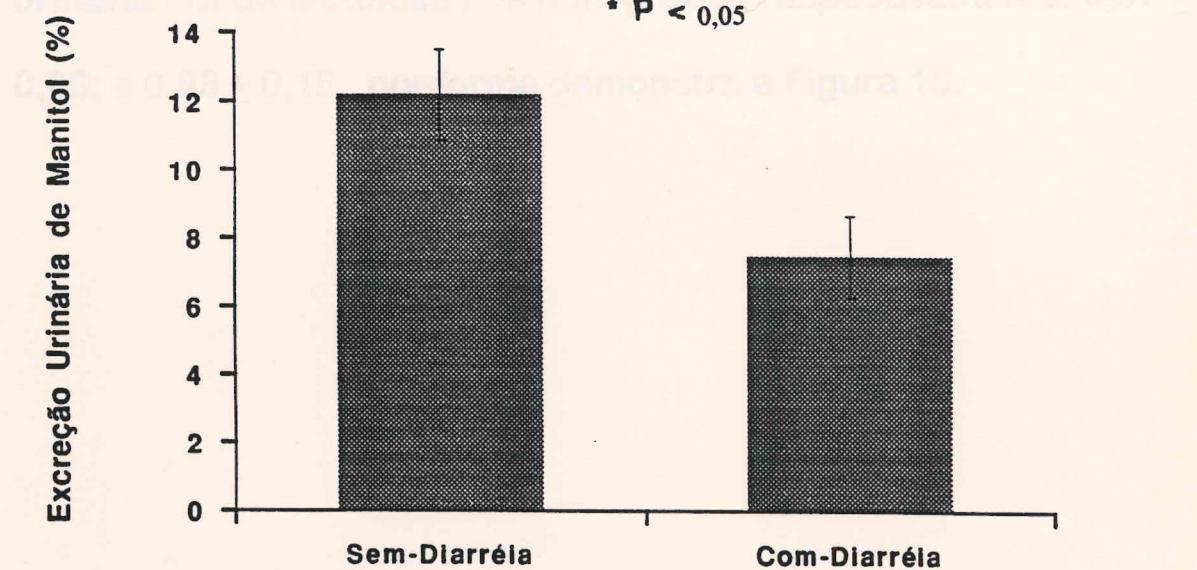
Figura 8. Histograma da taxa de excreção urinária de Lactulose/Manitol: pacientes HIV-positivos com e sem diarréia.



Nota-se ainda da análise da Figura 8, que a taxa de excreção urinária Lactulose/Manitol elevou-se dramaticamente nos pacientes com diarréia (média \pm erro-padrão = $0,187 \pm 0,050$) quando comparada à do grupo sem diarréia ($0,050 \pm 0,006$), $p<0,05$. Os resultados foram expressos pela média de análises duplas das amostras.

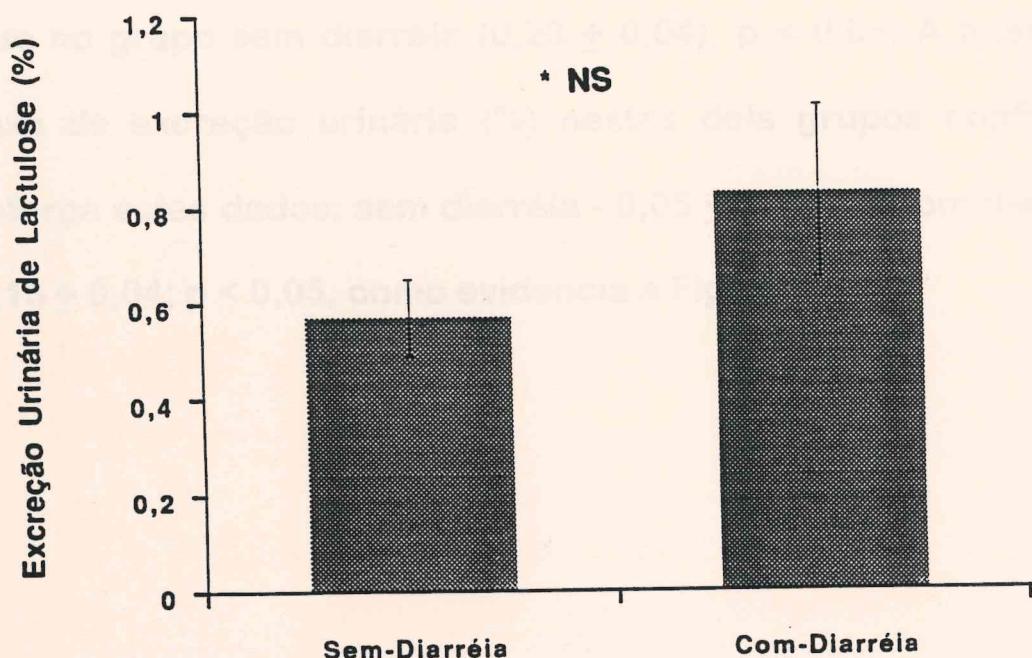
Nos nossos resultados, a eliminação urinária do manitol diminuiu significativamente (média \pm erro-padrão) nos pacientes portadores de HIV afetados por diarréia (grupo B: $75,07 \pm 12,07$ mg/l) em relação aos sem diarréia (grupo A: $121,92 \pm 13,34$ mg/l), $p<0,05$, com uma taxa de excreção (%) de $7,50 \pm 1,20$ no grupo com diarréia contra $12,18 \pm 1,33$ no grupo sem diarréia, $p < 0,05$, consoante demonstra a Figura 9.

Figura 9. Taxa de excreção urinária de Manitol (%) em pacientes HIV-positivos com e sem diarréia (média \pm erro-padrão).



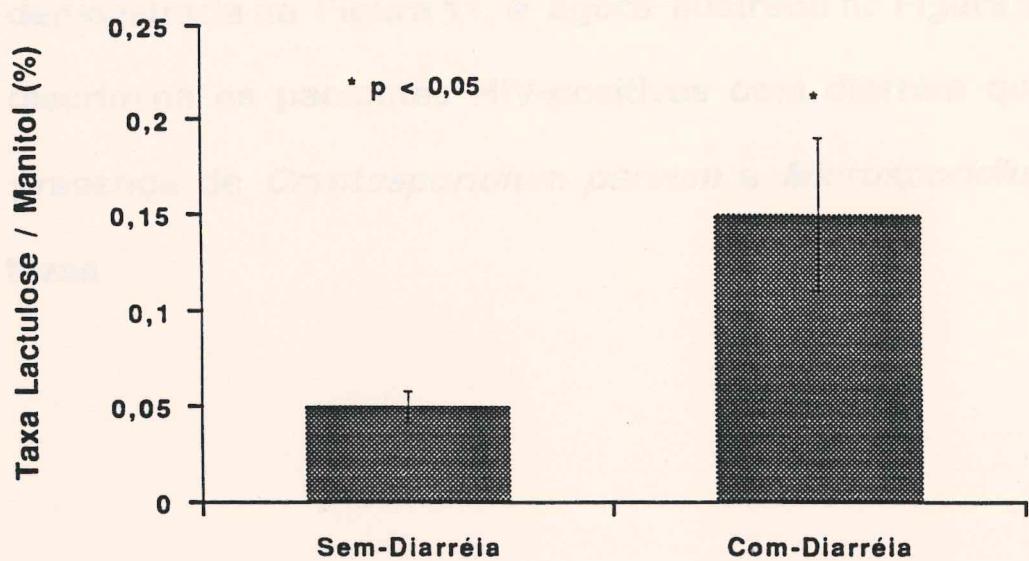
Para a eliminação urinária de lactulose, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (sem diarréia: $23,04 \pm 3,47$ mg/l; e com diarréia: $33,67 \pm 7,50$ mg/l), o que ficou mais evidente ainda comparando-se as taxas de excreção urinária (%) da lactulose nos dois grupos respectivamente: $0,57 \pm 0,08$; e $0,83 \pm 0,18$, conforme demonstra a Figura 10.

Figura 10. Taxa de excreção urinária de Lactulose (%) em pacientes HIV-positivos com e sem diarréia (média \pm erro-padrão).



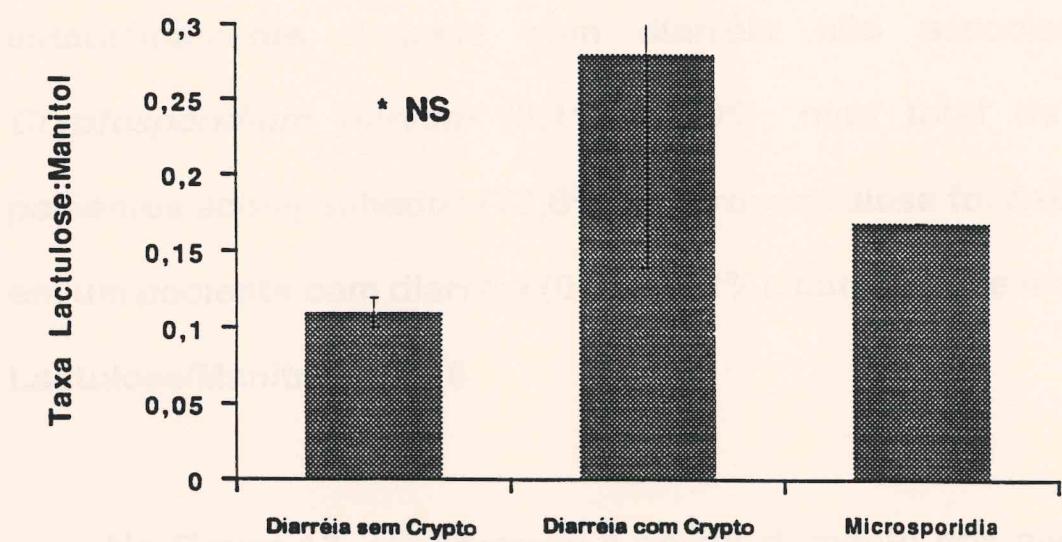
Nossos resultados mostraram ainda que a razão de eliminação Lactulose/Manitol na urina (média \pm erro-padrão) foi maior nos pacientes HIV-infectados com diarréia ($0,63 \pm 0,16$) do que no grupo sem diarréia ($0,23 \pm 0,04$), $p < 0,05$. A análise da taxa de excreção urinária (%) nestes dois grupos confirma e reforça estes dados: sem diarréia - $0,05 \pm 0,008$; e com diarréia - $0,15 \pm 0,04$; $p < 0,05$, como evidencia a Figura 11.

Figura 11. Taxa de excreção Lactulose/Manitol (%) na urina de pacientes HIV-infectados com e sem diarréia (média + erro-padrão).



A taxa de excreção urinária Lactulose/Manitol mais elevada no grupo com diarréia do que nos pacientes sem diarréia já demonstrada na Figura 11, é agora ilustrada na Figura 12, que discrimina os pacientes HIV-positivos com diarréia quanto à presença de *Cryptosporidium parvum* e *Microsporidium* nas fezes.

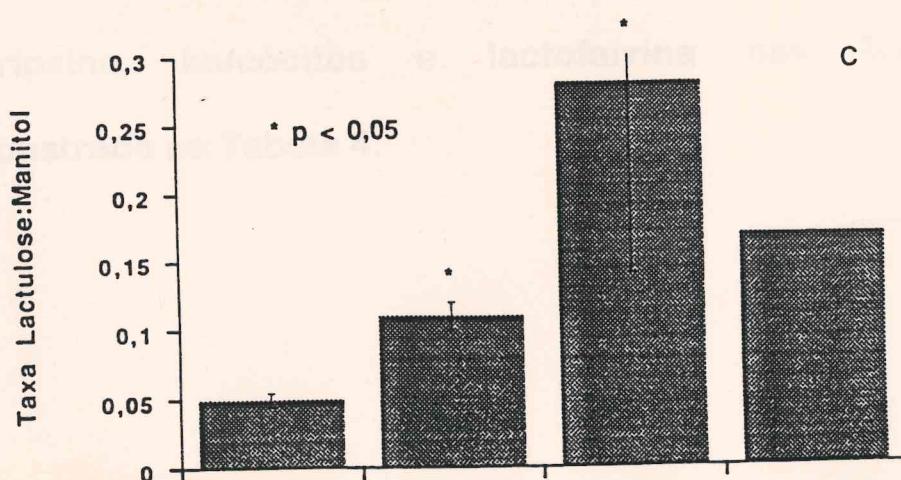
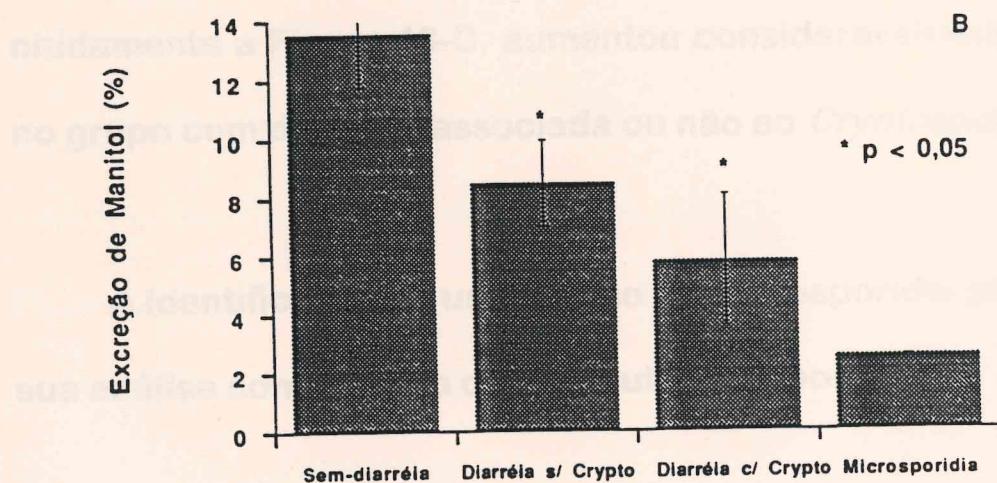
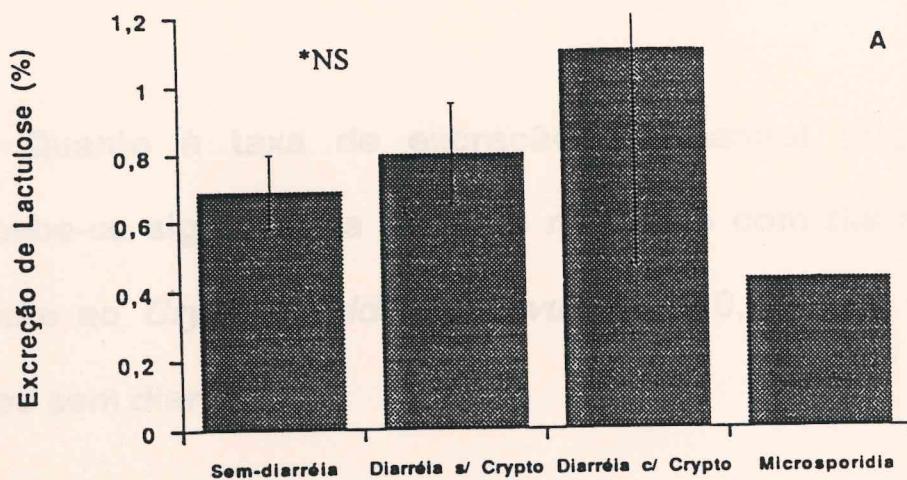
Figura 12. Taxa de excreção Lactulose/Manitol (%) na urina de pacientes HIV-positivos com diarréia, considerando-se sua etiologia (média ± erro-padrão).



Da Figura 12 deduz-se que o grupo com diarréia e criptosporidiose (5/19; 26,3%), que teve uma taxa de excreção Lactulose/Manitol (%) na urina de $0,28 \pm 0,14$, não diferiu estatisticamente daquele com diarréia não associada ao *Cryptosporidium parvum* ($0,11 \pm 0,01$), num total de 14/19 pacientes acompanhados (73,6%). Microsporidiose foi detectada em um paciente com diarréia (01/14; 7,1%), com taxa de excreção Lactulose/Manitol de 0,16.

Na Figura 13, observamos o comportamento dos pacientes HIV-positivos com diarréia e criptosporidiose, em relação àqueles com diarréia sem criptosporidiose, com diarréia por *Microsporidium* e também sem diarréia, levando-se em conta as taxas de excreção urinária de lactulose e manitol separadamente, bem como a própria taxa de excreção Lactulose/Manitol na urina.

Figura 13. Taxas de excreção urinária (%) de Lactulose, Manitol e Lactulose/Manitol de pacientes HIV-positivos com e sem diarréia, de acordo com a sua etiologia (média + erro-padrão).



A taxa de excreção da lactulose não difere estatisticamente entre os diversos grupos com e sem diarréia, com relação à sua etiologia, como vemos na Figura 13-A.

Quanto à taxa de excreção do manitol (Figura 13-B), percebe-se significativa redução no grupo com diarréia, ligada ou não ao *Cryptosporidium parvum* ($p < 0,05$), em relação ao grupo sem diarréia.

A taxa de excreção Lactulose/Manitol, conforme demonstra nitidamente a Figura 13-C, aumentou consideravelmente ($p 0,05$) no grupo com diarréia, associada ou não ao *Cryptosporidium*.

A identificação de um só caso de Microsporidia prejudicou a sua análise comparativa com os outros grupos.

O estudo dos grupos quanto à presença de alfa-1-antitripsina, leucócitos e lactoferrina nas fezes, está demonstrado na Tabela 4.

Da observação desta tabela, depreende-se que 40% dos pacientes com diarréia ligada ao *Cryptosporidium* (2/5) acusaram a presença de alfa-1-antitripsina nas fezes, o que não ocorreu em nenhum paciente com diarréia (0/14) sem relação com criptosporidiose.

Analizando especificamente a eliminação fecal de leucócitos, torna-se claro pelo exame da Tabela 4, que nenhum paciente do grupo sem diarréia em treze examinados, apresentou excreção de leucócitos, o que se verificou em 52,6% dos pacientes com diarréia (10/19), $p < 0,05$. Também houve diferença importante no que diz respeito aos leucócitos quando se considerou a provável etiologia da diarréia, pois, enquanto 80% (4/5) dos portadores de *Cryptosporidium parvum* com diarréia apresentaram leucócitos nas amostras fecais, apenas 50% (07/14) dos pacientes com diarréia não relacionada ao *Cryptosporidium* exibiram leucócitos nas fezes ($p < 0,05$).

Tabela 4. Alfa-1-antitripsina, leucócitos e lactoferrina fecal em pacientes HIV-infectados com e sem diarréia; presença ou não de *Cryptosporidium parvum* e *Microsporidium* no grupo com diarréia.

HIV-positivos	Alfa-1-AT	Leucócitos	Lactoferrina
Sem diarréia	7,6 (1/13)	0 (0/13)	15,3 (2/13)
Diarréia	10,5 (2/19)	52,6 (10/19)*	47,3 (9/19)*
Não-Crypto	0 (0/14)	50 (7/14)*	64,2 (9/14)*
Diarréia p/ Crypto	40 (2/5)	80 (4/5)**	60 (3/5)
Microsporidia	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)

& Os valores apontados são: % (número de positivos/total)

* p < 0,05 versus pacientes sem diarréia (qui-quadrado)

**p < 0,05 versus pacientes sem diarréia (teste de Fisher)

A investigação da lactoferrina, por sua vez, como também revela a Tabela 4, resultou na detecção de sua presença nas fezes em somente 15,3% (02/13) dos pacientes sem diarréia, contra uma taxa de 47,3% (09/19) nos HIV-infectados acometidos de diarréia ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente importante quando se comparou a etiologia da diarréia (presença ou não de *Cryptosporidium parvum*).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Trabalho pioneiro de Walker e Isselbacher (1974), corroborado por Menzies em 1984, demonstrou que a função da barreira intestinal é extremamente relevante para o conhecimento da etiologia e da patogênese de muitas doenças intestinais.

O caminho da pesquisa de provas com sondas moleculares foi aberto por Fordtran e cols., em 1965, ao fazer uma avaliação da permeabilidade intestinal humana, usando um método indireto. Desde então se aceita unanimemente que a sonda molecular ideal não deve ser reconhecida pelo sistema imune, necessitando entretanto mostrar-se desprovida de toxicidade, além de metabolicamente inerte. Por outro lado, exige-se dos processos de mensuração dessas substâncias sensibilidade, exatidão e facilidade de execução. Outrossim, quando a excreção urinária é utilizada para avaliar a absorção intestinal, faz-se

mister que o marcador de prova possua "clearance" renal quantitativo.

Alguns açúcares preenchem tais requerimentos, de modo que autores como Pearson e cols., 1982, Ukabam e cols., 1985, e Ford e cols., 1985, fizeram uso de dissacarídos como a lactulose e monossacarídos como o manitol, em estudos da permeabilidade intestinal em crianças e adultos com doenças gastrintestinais variadas, tipo doença celíaca, Crohn e distúrbios diarréicos e mal-absortivos. Estes estudos demonstraram que a permeabilidade a dissacarídos é significativamente aumentada, enquanto a absorção do manitol por, exemplo, está prejudicada.

Segundo Deitch, 1990, muitas variáveis podem influenciar os resultados dos testes em que um único marcador de absorção é empregado, razão pela qual técnicas de absorção diferenciada envolvendo, simultaneamente, dois marcadores se desenvolveram e ganharam espaço.

A grande vantagem da técnica com dois marcadores é que os efeitos capazes de gerar confusão a partir de variáveis irrelevantes com base no emprego de um só marcador, podem ser facilmente superados expressando-se a absorção como a razão entre dois marcadores. Assim demonstrou Menzies, 1983, alertando que fatores como motilidade intestinal, área da superfície absortiva, "clearance" renal e acurácia na coleta da urina, podem evidentemente alterar os resultados obtidos com um único marcador, mas não provocarão alteração na razão de absorção verificada entre dois marcadores, posto que serão ambos igualmente afetados.

Os dois açúcares mais utilizados com esta finalidade são a lactulose e o manitol. Eles diferem principalmente no tamanho molecular e na rota de absorção: o manitol tem um raio de 0,4 nm e é absorvido por via transcelular, através dos poros hidrofílicos da membrana celular; ao contrário, a rota de absorção da lactulose (raio de 0,52 nm) é paracelular, dependendo das zonas

de extrusão nas vilosidades e dos chamados espaços ou nexos juncionais espessados (Pearson, op. cit.).

Como já foi mencionado, a indexação da excreção urinária da lactulose à do manitol (usando-se a razão L/M) permite a correção de fatores não diretamente relacionados à permeabilidade intestinal, como o esvaziamento gástrico, o tempo de trânsito gastrintestinal, a área de mucosa absortiva, o débito cardíaco, a função renal, entre outros (Ziegler e cols., 1988).

Alterações na absorção da lactulose refletem vazamento mucoso, enquanto a queda na absorção do manitol correlaciona-se com uma diminuição da área funcional absortiva, fenômenos demonstrados com relativa facilidade nos trabalhos de LeVoyer e cols., 1992, e Lunn e cols., 1991.

A razão L/M pode estar aumentada por causa de uma redução na absorção do manitol (prejuízo funcional), verificado

por exemplo na doença celíaca e em manifestações diarréicas típicas de crianças desnutridas (Akinbami e cols., 1989), ou devido também a um incremento na absorção da lactulose por lesão mucosa (dano físico), como ocorre por exemplo em grandes queimados (LeVoyer, op. cit.).

O teste de dupla absorção de açúcares tipo Lactulose/Manitol, para aferir a permeabilidade intestinal, tem o grande mérito de não ser invasivo. Seu uso vinha sendo bastante limitado pela dificuldade de análise dos carboidratos na urina, em baixas concentrações.

O método HPLC-PAD, ou de cromatografia líquida de alta pressão acoplado com detecção amperométrica pulsada, resolve este problema. Por esta técnica, a lactulose e o manitol são separados entre si, bem como dos outros açúcares presentes na urina. A sensibilidade é elevada, comparando-se à do método de cromatografia em camada fina, além do que, o processo de preparação da amostra é extremamente simples e rápido para

todos os glicídios estudados, com recuperação quase absoluta dos mesmos, ultrapassando com vantagens inquestionáveis os complicados métodos enzimáticos anteriormente utilizados (Simon e cols., 1990). Este autor, no ano de 1993, publicou interessante artigo aplicando o manitol e a lactulose como sondas moleculares na investigação de alterações da permeabilidade intestinal em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. O fato de as sondas moleculares serem totalmente inócuas, valoriza seu uso potencial em pacientes imunodeprimidos.

Teste de Validação do HPLC-PAD

A linearidade do método que empregamos foi estabelecida a partir da adição de quantidades conhecidas dos padrões (nove tipos de açúcares analisados) a alíquotas de 50 μ l obtidas das amostras de urina dos pacientes. A relação de linearidade foi mantida para concentrações variando de 3 a 10 nmol por injeção

de cada padrão testado, o que revela a grande reprodutibilidade da técnica.

Por outro lado, os tempos de retenção bem separados, sem picos coincidentes ou superpostos para todos os padrões examinados (com no mínimo 2 minutos em média de intervalo), e principalmente uma "distância" de 6 minutos em média, entre os tempos de retenção do manitol e da lactulose, tornam o método de grande precisão e altamente exequível do ponto de vista prático. Esta sensibilidade é ainda reforçada quando se comparam os tempos correspondentes de retenção e as quantidades medidas das amostras, verificando-se um erro padrão menor que 2,5% e 3,5%, respectivamente.

Do mesmo modo, os limites de detecção e as concentrações mínimas quantificadas para o manitol e a lactulose respectivamente (Tabela 3), corroboram a elevada precisão e sensibilidade desta técnica cromatográfica.

Trabalhos de vulto empregando a mesma técnica encontraram resultados similares: Fleming (1990), estudando voluntários sadios para validação do teste de permeabilidade intestinal, demonstrou sua linearidade com concentrações de até 3 g/l, além de exibir limites de detecção de 0,3 mg de lactulose por litro de urina. A recuperação urinária dos açúcares analisados variou de 90 a 107%, havendo boa concordância quando comparada com a análise por cromatografia gasosa ($r = 0,993$, para a lactulose; e $r = 0,984$, para o manitol).

O mesmo autor, em 1993, comparando alterações da permeabilidade entre ingleses portadores de AIDS e caucasianos sadios, mediante análises urinárias e plasmáticas, mostrou mais uma vez ser o método linear para valores de manitol de até 125 mg/l, e de lactulose até a faixa de 40 mg/l. O limite de detecção para a lactulose foi de 0,4 mg/l na urina e no plasma. A precisão da técnica foi demonstrada por um erro padrão variando de 1,8 a 8,5%. Os diferentes tempos de retenção para os açúcares

estudados afastam a possibilidade de interferências significativas na interpretação dos gráficos.

Sorensen, também no ano de 1993, utilizando o teste experimentalmente em cães para diversos açúcares, detectou para a lactulose uma recuperação de $100 \pm 6,1$ (média \pm desvio-padrão), com Coeficiente de Variação (C.V.) de 5,5%. A linearidade da curva padrão indicou um limite inferior de 0,1 mg/l para todos os açúcares testados.

Willems e cols., neste mesmo ano, realizando estudo comparativo com biópsias em crianças com distúrbios absorptivos intestinais, obtiveram uma recuperação média de 99% e 100% respectivamente, para a lactulose e o manitol, com C.V. após 10 repetições de 3% e 2,9%, respectivamente, para a lactulose e o manitol.

Todos esses dados reforçam nossa indicação da técnica de cromatografia líquida de alta pressão com detecção

amperométrica pulsada, para avaliação de alterações da permeabilidade intestinal, com a grande vantagem de ser inócuia, não invasiva, de execução fácil, com altas precisão e sensibilidade.

Os resultados que obtivemos, por sua vez, ratificam a real utilidade do método, porquanto detectamos relevante redução na absorção do manitol e consequente excreção urinária (média \pm erro-padrão) nos pacientes portadores de HIV acometidos de diarréia ($75,10 \pm 12,07$ mg/l) em relação aos sem diarréia (121,92 \pm 13,34 mg/l), que pode ser ratificada, levando-se em conta a taxa de excreção (%) desse açúcar na urina dos grupos sem diarréia (12,18 \pm 1,33) e com diarréia (7,50 \pm 1,20) respectivamente, $p < 0,05$, evidenciando assim um nítido comprometimento da função absortiva como um todo (área mucosa atuante diminuída) nestes pacientes (Figura 9).

No que se refere à lactulose, cujo débito urinário não se alterou de forma significativa, nossos dados ($23,04 \pm 3,47$ mg/l)

para os pacientes sem diarréia e $33,67 \pm 7,50$ mg/l (para os pacientes com diarréia), com uma taxa de excreção urinária (%) respectivamente de $0,57 \pm 0,08$ e $0,83 \pm 0,18$ (Figura 10), corroboram o apresentado por Pearson e cols. (op. cit.), ao estudarem crianças com doença de Crohn e doença celíaca. A literatura especializada, no entanto, registra alterações significativas na dosagem urinária deste dissacarídio (Laker e Menzies, 1977; Wheeler e cols., 1978).

Possivelmente, a diferença estabelecida entre os resultados que alcançamos e os daqueles pesquisadores se deveu ao fato de termos utilizado solução oral de menor osmolaridade. Aliás, o próprio Menzies, ainda em 1974, demonstrou modificações nos complexos juncionais e zonas de extrusão na doença celíaca, apenas quando fazia uso de soluções bastante hipertônicas.

Muitos autores, entre os quais destacamos Ukabam e cols., 1984 (op. cit.); Jackson e cols., 1981; Sundqvist e cols., 1980; consideram rigorosamente válido como critério para o

estabelecimento de alterações na permeabilidade da mucosa intestinal, somente o índice compreendido pela razão Lactulose/Manitol, porque, como já frisamos, afasta outros fatores com possibilidade de gerar erro, por confundir ou mascarar a fiel interpretação do método.

No nosso caso, a relação L/M confirmou modificação significativa na permeabilidade do intestino delgado ($p<0,05$), provavelmente relacionada a processos inflamatórios freqüentes nos pacientes acometidos de diarréia crônica e portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida ($0,63 \pm 0,16$), contra $0,23 \pm 0,04$ dos pacientes infectados sem diarréia, implicando numa taxa de excreção urinária (%) respectivamente de $0,15 \pm 0,04$ e $0,05 \pm 0,008$ (Figura 11), embora não possamos precisar, como costuma acontecer com a comunidade científica internacional, se a contribuição fisiopatológica mais importante para tais alterações origina-se de infestações por parasitas oportunistas, ou mesmo se é devida a fenômenos ou

manifestações imunopatológicas próprias da evolução da doença em questão.

A análise das fezes acusou alta relevância ($p < 0,05$) para a presença de *Cryptosporidium* nos pacientes HIV-positivos com diarréia (5/19; 26,3%), comparada a nenhum caso em 13 pacientes sem diarréia. Mais interessante foi a evidente correlação ($p < 0,05$) entre a presença de *Cryptosporidium* nas fezes dos pacientes com AIDS e diarréia e a taxa de excreção urinária de manitol, bem como a associação diarréia-cryptosporidiose com elevada taxa de excreção urinária Lactulose/Manitol (Figuras 12 e 13), indicando a viabilidade do método como parâmetro de avaliação funcional e prognóstica de lesão mucosa intestinal nos portadores de AIDS.

Este protozoário oportunista causa a infecção inicial da AIDS em cerca de 2% dos pacientes nos Estados Unidos (Navin e Hardy, 1987), e em 16% dos pacientes com esta síndrome e diarréia em estudos prévios de Laughon e cols. (1988), bem como

em aproximadamente 57% dos pacientes com esta doença e diarréia crônica no Haiti (Malebranche e cols., 1983). No Brasil, em Fortaleza-Ceará, trabalho de destaque realizado por Wuhib e cols., estudando pacientes HIV-positivos no Hospital São José (1994), identificou no exame parasitológico de fezes inicial (de admissão ao protocolo) oocistos de *C. parvum* em 21,4% (18/84) dos pacientes com diarréia; e em apenas 5% (4/82) dos pacientes sem diarréia ($p < 0,05$), corroborando assim também os nossos resultados.

O *Cryptosporidium* é, por conseguinte, uma das causas de diarréia crônica e mal-absorção em pacientes com AIDS (CDC, 1984). A severidade da criptosporidiose humana nos pacientes HIV-positivos pode estar relacionada com o grau de comprometimento do sistema imune destes pacientes (Chacin-Bonilla e cols., 1992).

A patogênese da diarréia por *Cryptosporidium* é pouco entendida. O amplo volume fecal e a má absorção usualmente

vistos na doença por HIV e em outros pacientes imunocomprometidos, juntamente com a ausência de células inflamatórias, sugerem que a diarréia é secretória (Garza e cols., 1986).

Ao contrário do registrado por Tanowitz e cols.(1992), não detectamos correlação significativa para atribuir a diarréia evidenciada nos pacientes HIV-positivos à infestação por outros protozoários e helmintos em geral.

Alguns estudos prospectivos sobre a diarréia crônica em pacientes com AIDS, sugerem que patógenos entéricos identificáveis contribuem para cerca de 75 a 85% dos casos (Bartlett e cols., 1992; Greenson e cols., 1991; e Smith e cols., 1988). Entre os principais agentes envolvidos destacam-se: *E. coli* enterohemorrágica; *E. coli* enteroagregante; *Microsporidium*; organismos cianobactérias-símile; diversas espécies de *Mycobacterium* e de *Campylobacter*, além do *Citomegalovirus*.

A maioria das infecções bacterianas cursa com processos febris, dor abdominal, freqüentes evacuações pouco volumosas e presença quase constante de leucócitos nas fezes. Nosso trabalho demonstrou, igualmente, uma elevada significância na correlação da diarréia crônica do paciente HIV positivo (10/19; 52,6%) com a presença de leucócitos nas fezes ($p < 0,01$), enquanto nenhum paciente sem diarréia apresentou eliminação fecal de leucócitos (0/13).

Quanto à presença de alfa-1-antitripsina nas fezes, interessante é que, mesmo não havendo diferença entre os grupos com e sem diarréia (respectivamente 2/19; 10,5% e 1/13; 7,6%), vale destacar, entretanto, a associação diarréia-cryptosporidiose e a excreção fecal desta proteína (2/5; 40%), já que ela não foi encontrada em qualquer dos pacientes com diarréia não relacionada ao *Cryptosporidium* (0/14). Este fato vem confirmar a importância clínica dada pela comunidade científica à presença deste parasita na fisiopatologia dos distúrbios absortivos nos pacientes HIV-positivos.

Por outro lado, a evidente relação entre a detecção de lactoferrina nas fezes de pacientes HIV-positivos com diarréia (9/19; 47%), em comparação com pacientes infectados mas sem diarréia (2/13; 15,3%), apenas veio ratificar para nossos resultados o que foi constatado em diversos outros trabalhos nesta área.

Já o *Microsporidium (Enterocytozoon bieneusi)*, muito valorizado por pesquisadores (Kotler e cols., 1990; Weber e cols., 1986) como responsável, ou, pelo menos participante da etiopatogenia da diarréia no paciente portador de AIDS, não se mostrou relevante em nosso trabalho, verificando-se somente em um entre os 32 pacientes investigados.

As considerações de natureza fisiopatológicas para explicar a diarréia crônica no portador de AIDS, esbarram numa multiplicidade de fatores, estejam eles associados ou não à imunodeficiência intrínseca da doença, incluindo a própria

infecção do intestino pelo HIV e/ou outros agentes virais; desnervação autonômica; deficiência de lactase; desregulação do sistema imune entérico; produção local de linfocinas; e proliferação de bactérias e outros parasitas no intestino delgado. Mesmo assim, em um grande número de pacientes não se consegue detectar qualquer agente causal, rotulando-se o processo como idiopático (Levine e cols., 1991; e Ullrich e cols., 1989).

RESUMO

Este estudo teve como objetivo demonstrar a validade do teste de permeabilidade emprenetrando a razão lactulose/mannitol como critério diagnóstico e diagnóstico da testa non difusa absorção da lactulose intestinal.

Foram constatadas evidentes alterações da permeabilidade da mucosa intestinal em pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo, portadores da síndrome da irregulilidade, apresentando diarréia crônica, através da medida das concentrações de manitol e lactulose.

CONCLUSÃO

Foram constatadas evidentes alterações da permeabilidade da mucosa intestinal em pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo, portadores da síndrome da irregulilidade, apresentando diarréia crônica, através da medida das concentrações de manitol e lactulose.

Assim, é de alta prioridade, a análise clínica dos sintomas malabsorptivos, com amostras de urina, utilizando-se a técnica de radioisotrópico seguida de alta pressão, com coluna de alta eficiência, que possa fazer delação emprenetrada profunda.

Assim, é de alta prioridade, a análise clínica dos sintomas malabsorptivos, com amostras de urina, utilizando-se a técnica de radioisotrópico seguida de alta pressão, com coluna de alta eficiência, que possa fazer delação emprenetrada profunda.

Assim, é de alta prioridade, a análise clínica dos sintomas malabsorptivos, com amostras de urina, utilizando-se a técnica de radioisotrópico seguida de alta pressão, com coluna de alta eficiência, que possa fazer delação emprenetrada profunda.

Assim, é de alta prioridade, a análise clínica dos sintomas malabsorptivos, com amostras de urina, utilizando-se a técnica de radioisotrópico seguida de alta pressão, com coluna de alta eficiência, que possa fazer delação emprenetrada profunda.

CONCLUSÃO

1. Demonstrou-se a validade do teste de permeabilidade empregando a razão Lactulose/Manitol como critério farmacológico e diagnóstico de lesão com déficit absorutivo da mucosa intestinal.

2. Foram constatadas evidentes alterações na permeabilidade da mucosa intestinal em pacientes do Hospital São José, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida apresentando diarréia crônica, através do uso de sondas farmacológicas de manitol e lactulose.

3. É de alta precisão, a análise direta dos açúcares manitol e lactulose em amostras de urina, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta pressão, com coluna de troca aniônica, acoplada com detecção amperométrica pulsada.

REFERÊNCIAS

- # REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

01. AKINBAMI, F.O., BROWN,G.A., MCNEISH, A.S. Intestinal permeability as a measure of small intestinal mucosal integrity: correlation with jejunal biopsy. Afr J Med Sci , v.18, p. 187-192, 1989.
02. ALAM, A.N., SARKER, S.A., WAHED, M.A., et al. Enteric protein loss and intestinal permeability changes in children during acute shigellosis and after recovery: effect of zinc supplementation. Gut , v. 35, p. 1707-1711, 1994.
03. AMATO NETO, V. Exame parasitológico de fezes. In: Monografias médicas, série Clínica Médica, v. 9, 1980.

04. BARTLETT, J.G., BELITSOS, P.C., SEARS, C.L. AIDS enteropathy. Clin Infect Dis , v. 15, p. 726-735, 1992.
05. BEHRENS, R.H., DACHERLY, H., ELIA, M. et al. A simple enzymatic method for the assay of urinary lactulose. Clin Chem Acta , v. 137, p. 361-367, 1984.
06. BJARNASON, I., PETERS, T.J. A persistent defect in intestinal permeability in coeliac disease demonstrated by a ⁵¹Cr-labelled EDTA absorption test. Lancet , v. 1, p. 323-325, 1983.
07. BERNIER, J. J., FLOREN, C. H., DESMAZURES, C. H. et al. Diagnosis of protein-losing enteropathy by gastrintestinal clearance of alpha-1-antitrypsin. Lancet , ii: p. 763 - 764, 1978.

08. BLANSHARD, C., ELLIS, D. S., TOVEY, G. et al. Electron microscopy of rectal biopsies in HIV-positive individuals. J Pathol, v. 169, n. 1, p. 79-87, 1993.
09. BLOMQUIST, L., BARK, T., HEDENBORG, G. et al. Comparison between the lactulose/mannitol and ⁵¹Cr-EDTA / ¹⁴C-mannitol methods for intestinal permeability. Frequency distribution pattern and variability of markers and marker ratios in healthy subjects. Scand J Gastroenterol, v. 28, n. 3, p. 274-280, 1993.
10. BRANDONISIO, D., MAGGI, P., PANARO, M. A. et al. Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients with diarrhoeal illness. Eur J Epidemiol, v. 9, n. 2, p. 190-194, 1993.
11. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS). United States. In: MMWR, v. 31, p. 507-508, p. 513-514, 1982.

12. _____. Update: Treatment of cryptosporidiosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In: **MMWR**, v. 33, p. 117, 1984.
13. _____. A manual for the treatment of diarrhea for use by physicians and after senior health workers. WHO document. In: **WHO/CDD/SER**, v. 80, n. 2, 1990.
14. CHACIN-BONILLA, L., GUANIPA, N., CANO, G. et al. **Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulín State, Venezuela.** Am Soc Trop Med Hyg, v. 47, n. 5, p. 582-586, 1992.
15. COBDEN, I., DICKINSON, R., ROTHWELL, J. et al. **Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: results in coeliac disease.** Br Med J, ii: p. 1060, 1978.

16. _____. et al. Intestinal permeability and screening tests for coeliac disease. Gut, v. 21, p. 512-518, 1980.
17. COLEBUNDERS, R., MANN, J. M., FRANCIS, H. et al. Evaluation of a clinical case-definition of acquired immunodeficiency syndrome in Africa. Lancet, i: p. 492-494, 1987.
18. CORCORAN, A.C., PAGE, I.H. A method for the determination of mannitol in plasma and urine. J Biol Chem, v. 170, p. 165-171, 1947.
19. CROSSLEY, J. R., ELLIOTT, R. B. Simple method for diagnosing protein-losing enteropathies. Br Med J, i: p. 428-429, 1977.
20. DAHLQUIST, A., GRYBOSKI, J. D. Inability of the human small intestinal lactase to hydrolise lactulose. Biochim Biophys Acta, v. 110, p. 635-636, 1965.

21. DEHOVITZ, J. A., PAPE, J. W., BONCY, M. et al. Clinical manifestations and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med, v. 315, p. 87-90, 1986.
22. DEITCH, E. A. Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. Surgery, v. 107, p. 411-416, 1990.
23. ELIA, M., GOREN, A., BEHRENS, R. et al. Effect of total starvation and very low calorie diets on intestinal permeability in man. Clin Sci, v. 73, p. 205-210, 1987.
24. EHRENPREIS, E. D., GANGER, D.R., KOCHVAR, G.T. et al. D-xylose malabsorption: characteristic finding in patients with the AIDS wasting syndrome and chronic diarrhea. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 5, p. 1047-1050, 1992.

25. FAHEY, J. L., MCKELVEY, E. M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J Immunol., v. 94, p. 84-90, 1965.
26. FEDORKO, D. P., NELSON, N. A., CARTWRIGHT, C. P. Identification of Microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. J Clin Microbiol, v. 33, n. 7, p. 1739-1741, 1995.
27. FLEMING, S.C., KAPEMBWA, M.S., LAKER, M.F. et al. Rapid and simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. Clin Chem, v. 36, n. 5, p. 797-799, 1990.

28. _____. et al. Analysis of multiple sugar probes in urine and plasma by high - performance anion - exchange chromatography with pulsed electrochemical detection: Application in the assessment of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. J Chromatogr , v. 640, p. 293-297, 1993.

29. FORD, R.P., MENZIES, I.S., PHILLIPS, A.D. et al. Intestinal sugar permeability: Relationship to diarrhoeal disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr , v. 4, p. 568-574, 1985.

30. FORDTRAN, J. S., RECTOR, F. C. et al. Permeability characteristics of the human small intestine. J Clin Invest , v. 44, p. 1935-1944, 1965.

31. _____. et al. Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue. J Clin Invest , v. 46, p. 287-298, 1967.

32. GARZA, D. M., FEDORAK, R. N., SOAVE, R. Enterotoxin-like activity in cultured cryptosporidiosis: Role in diarrhea. Gastroenterol , v. 90, p. 1424, 1986.
33. GORDON, R.S. Exudative enteropathy: abnormal permeability of the gastrointestinal tract demonstrable with labelled polyvinylpyrrolidone. Lancet , i: p. 325-326, 1959.
34. GOTTLIEB, M S., GROOPMAN, J.E., WEINSTEIN, W.M. et al. The acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med , v. 99, p. 208-220, 1983.
35. GREENSON, J.K., BELITSOS, P.C., YARDLEY, J.H. et al. AIDS enteropathy : occult enteric infections and duodenal mucosal alterations in chronic diarrhea. Ann Intern Med , v. 115, p. 366-372, 1991.

36. GRYBOSKI, J.D., THAYER, W.R., GABRIELSON, J.W. et al. Dissacchariduria in gastrointestinal disease. Gastroenterol, v. 45, p. 633-637, 1963.
37. GUERRANT, R.L., HUGHES, J.M., LIMA, N.L. et al. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. Rev Infect Dis, v. 12, p. 541-550, 1990.
38. _____, ARAUJO, V., LIMA, A. A. M. et al. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. J Clin Microbiol, v. 30, p. 1238-1342, 1992.
39. HARRIS, J. C., DuPONT, H. L., HORNICK, B. R. Fecal leukocytes in diarrheal illness. Ann Intern Med, v. 76, p. 697-703, 1971.

40. HAMILTON, I., COBDEN, I., ROTHWELL, S. et al. Intestinal permeability in coeliac disease: the response to gluten withdrawal and single dose gluten challenge. Gut, v. 23, p. 202-210, 1982.
41. IRVING, C.S., LIFSCHITZ, C.H., MARKS, L.M. et al. Decreased intestinal permeability of polyethylene glycol (PEG) 400 polymers in children with mucosal damage. Gastroenterol, v. 84, p. 1195, 1983.
42. JACKSON, P. G., LESSOF, M. H., BAKER, R. W. R. et al. Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy. Lancet, i: p. 1285-1286, 1981.
43. JOHANSON, J.F., SONNENBERG, A. Efficient management of diarrhea in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Ann Intern Med, v. 112, p. 942-948, 1990.

44. KOTLER, D. P., GAET, H. P., LANGE, M. et al. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome.

Ann Intern Med , v. 101, p. 421-428, 1984.

45. _____. et al. Small intestinal injury and parasitic disease in AIDS. Ann Intern Med , v. 113, p. 444-449, 1990.

46. _____. et al. Chronic bacterial enteropathy in patients with AIDS. J Infect Dis , v. 171, p. 552-558, 1995.

47. KYNASTON, J. A., FLEMING, S. C., LAKER, M. F. et al. Simultaneous quantification of mannitol, 3-O-methyl glucose, and lactulose in urine by HPLC with pulsed electrochemical detection, for use in studies of intestinal permeability. Clin Chem , v. 39, n. 3. p. 453-456, 1993.

48. LAKER, M. F., MENZIES, I. S. Increase in human intestinal permeability following ingestion of hypertonic solutions. J Physiol, v. 265, p. 881-894, 1977.
49. _____. et al. Evaluation of mannitol for use as a probe marker of gastrointestinal permeability. Eur J Clin Invest, v. 12, p. 485-491, 1982.
50. LAUGHON, B. E., DRUCKMAN, D. A., VERNON, A. A. et al. Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without AIDS. Gastroenterol, v. 94, p. 984-993, 1988.
51. LEVINE, W. C., BUEHLER, J. W., BEAN, N. H. et al. Epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. J Infect Dis, v. 164, p. 81-87, 1991.

52. LEVOYER, M.C., CIOFFI, W.G., PRATT, L. et al. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. Arch Surg, v. 127, p. 26-30, 1992.
53. LIFSCHITZ, C. Intestinal permeability. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 4, p. 520-522, 1985.
54. LIM, S. G., MENZIES, I. S., LEE, C. A. et al. Intestinal permeability and function in patients infected with human immunodeficiency virus. A comparison with coeliac disease. Scand J Gastroenterol, v. 28, n. 7, p. 573-580, 1993.
55. LUNN, P. G., NORTHROP-CLEWES, C. A., DOWNES, R. M. Chronic diarrhoea and malnutrition in the Gambia: Studies of intestinal permeability. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 85, p. 8-11, 1991.

56. MAC FADYEN, D.A. Estimation of formaldehyde in biological mixtures. Biol Chem , v. 158, p. 107-133, 1945.

57. MALEBRANCHE, R., ARNOUX, E., GRERIN, J. M. et al. Acquired immunodeficiency syndrome with severe gastrointestinal manifestations in Haiti. Lancet , v. 2, p. 873-878, 1983.

58. MAXTON, D. G., BJARNASON, I., REYNOLDS, A. P. et al. Lactulose, ⁵¹Cr-labelled ethylenediaminetetraacetate, L-rhamnose and polyethyleneglycol 400 as probe markers for assessment *in vivo* of human intestinal permeability. Clin Sci, v. 71, p. 71-80, 1986.

59. MENZIES, I.S. Absorption of intact oligosaccharides in health and disease. Biochem Soc Trans , v. 2, p.1042-1046, 1974.

60. _____, MOUNT, J. N., WHEELER, M. J. Quantitative estimation of clinically important monosaccharides in plasma by rapid thin-layer chromatography. Ann Clin Biochem, v. 15, p. 65-76, 1978.
61. _____, POUNDER, R., LAKER, M. F. et al. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. Lancet, v. 2, p. 1107-1109, 1979.
62. _____. Transmucosal passage of inert molecules in health and disease. In: Intestinal absorption and secretion. Falk Symposium, London: MTP Press, v. 36, p. 527-543, 1983.
63. _____. Absorption of intact oligosaccharide in health and disease. Bioch Soc Trans, v. 2, p. 1042-1047, 1984.

64. MULLER, M., WALKER-SMITH, J., SHMERLING, D. H. et al.
Lactulose: A gas-liquid chromatography method of determination and evaluation of its use to assess intestinal mucosal damage. Clin Chem Acta , v. 24, p. 45-49, 1969.
65. NAVIN, T.R., HARDY, A.M. Cryptosporidiosis in patients with AIDS (letter). J Infect Dis , v. 155, p. 150, 1987.
66. NORTHROP, C.A., LUNN, P.G., BEHRENS, R.H. Automated enzymatic assays for the determination of intestinal permeability probes in urine. 1. Lactulose and lactose. Clin Chim Acta , v. 187, p. 79-88, 1990.
67. OKHUYSEN, P., SCERPELLA, E., MATHEWSON, J. et al. Utility of a rapid latex agglutination test for lactoferrin for predicting infection due to invasive enteropathogens. In: ICAAC, 1992.

68. PEARSON, A.D., EASTHAM, J., LAKER, M.F. et al. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. Br Med J , v. 285, p. 20-21, 1982.
70. QUIGLEY, E. M., ROSS, I. N., HAENEY, M. R. et al. Reassessment of faecal alpha-1-antitrypsin excretion for use as screening test for intestinal protein loss. J Clin Pathol , v. 40, p. 61-66, 1987.
70. RABENECK, L., POPOVIC, M., GARTNER, S. et al. Acute HIV infection presenting with painful swallowing and esophageal ulcers. JAMA , v. 263, p. 2318-2322, 1990.
70. RIBEIRO, Jr. H., RIBEIRO, T., MATTOS, A. et al. Treatment of acute diarrhea with oral rehydration solutions containing glutamine. J Am Col Nutr , v. 13, n. 3, p. 251-255, 1994.

72. ROUMEN, R. M. H., HENDRIKS, T., WEVERS, R. A. et al. Intestinal permeability after severe trauma and hemorrhagic shock is increased without relation to septic complications. Arch Surg. v. 128, p. 453-457, 1993.
73. ROY, S.K., BEHRENS, R.H., HAIDER, R. et al. Impact of zinc supplementation on intestinal permeability in Bangladeshi children with acute diarrhoea and persistent diarrhoea syndrome. J Pediat Gastroenterol Nutr , v. 15, p. 289-296, 1992.
74. RYBOLT, A.H., LAUGHON, B.E., BENNETT, R.G. et al. Protein-losing enteropathy associated with Clostridium difficile infection. Lancet , i: p. 1343-1355, 1989.
75. SILVA, E. S. Estudo do conteúdo de lactoferrina fecal em diarréia infecciosa. Fortaleza, 1994. 79p. Tese (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará, 1994.

76. SIMON, D., WEISS, L. M., TANOWITZ, H. B. et al. Light microscopic diagnosis of human microsporidiosis and variable response to octreotide. Gastroenterol, v. 100, p. 271-273, 1990.
77. SMITH, P.D., LANE, H.C., GILL, V.J. et al. Intestinal infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Etiology and response to therapy. Ann Intern Med, v. 108, p. 328-333, 1988.
78. SORENSEN, S.H., PROUD F.J., ADAM, A. et al. A novel HPLC method for the simultaneous quantification of monosaccharides and disaccharides used in tests of intestinal function and permeability. Clin Chim Acta, v. 221, p. 115-125, 1993.
79. STEVENSON, W.S. In: Estatística aplicada à administração. São Paulo: Ed. Harbra, 1986. cap. 14, p. 340-394.

80. SULLIVAN, P.B., LUNN, P.G., CROWE, P.T. et al. Persistent diarrhea and malnutrition - The impact of treatment on small bowel structure and permeability. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 14, p. 208-215, 1992.

81. SUNDQUIST, T., MAGNUSSON, K. E., SJODAHL, R. et al. Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. II: Application of low molecular weight polyethyleneglycol and a deterministic mathematical model for determining intestinal permeability in man. Gut, v. 21, p. 208-214, 1992.

82. TAGESSON, C., SJODAHL, R. Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract: Urinary recovery of different-sized polyethylene glycols after intravenous and intestinal deposition. Scand J Gastroenterol, v. 19, p. 315-320, 1984.

83. TANOWITZ, H. B., SIMON, D., WITTNER, M. Gastrointestinal manifestations. Med Clin North Am , v. 76, p. 45-61, 1992.
84. TEAHON, K., SMETHURST, P., LEVI, A. J. et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. Gut , v. 33, p. 320-323, 1992.
85. THEA, D. M., GLASS, R., GROHMAN, G. S. et al. Prevalence of enteric viruses among hospital patients with AIDS in Kinshasa, Zaire. Trans Royal Soc Trop Med Hyg , v.87, p. 263-266, 1993.
86. UKABAM, S.O., COOPER, B.T. Small intestinal permeability to mannitol, lactulose, and polyethylene glycol 400 in celiac disease. Dig Dis Sci , v. 29, p. 809-816, 1984.

87. ULLRICH, R., ZEITZ, M., HEISE, W. et al. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): Evidence for HIV-induced enteropathy. Ann Intern Med, v. 111, p. 15-21, 1989.
88. WALDMAN, T. A. Gastrointestinal protein loss demonstrated by ⁵¹ Cr-labelled albumin. Lancet, ii: p. 121-123, 1961.
89. WALKER, A.W., ISSELBACHER, K.J. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. Gastroenterol, v. 67, p. 531-550, 1974.
90. WEBER, J. Gastrointestinal disease in AIDS. Clin Immunol Allergy, v. 6, p. 519-530, 1986.
91. WHEELER, P. G., MENZIES, I. S., CREAMER, B. Effect of hyperosmolar stimuli and coeliac disease on the permeability of the human gastrointestinal tract. Clin Sci Mol Med, v. 54, p. 495-501, 1978.

92. WILLEMS, D., CADRANEL, S., JACOBS, W. Measurement of

urinary sugars by HPLC in estimation of intestinal permeability: Evaluation in pediatric clinical practice.

Clin Chem , v. 39, n. 5, p. 888-890, 1993.

93. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Persistent diarrhoea in

children in developing countries: Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO, v. 66, p. 709-717, 1988.

94. WUHIB, T., SILVA, T. M. J., NEWMAN, R. D. et al.

Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in Northeastern Brazil. J Infect Dis , v. 170, p. 494-497, 1994.

95. WYATT, J., VOGELSANG, H., HUBL, W. et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. Lancet, v. 341, p. 1437-1439, 1993.
96. ZIEGLER, T. R., SMITH, R. J., O'DWYER, S. T. et al. Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. Arch Surg, v. 123, p. 1313-1319, 1988.

ANEXOS



ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DE SAÚDE
HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECIOSAS

A Comissão de Ética do Hospital São José, após ter avaliado o projeto de tese de mestrado da Dra. Ângela M^a. Rodrigues Gifoni "ESTUDO SOBRE ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM PORTADORES DE HIV COM DIARRÉIAS ATRAVÉS DE SONDAS MOLECULARES, DE MONITOL E LACTULOSE", concorda com a realização do mesmo em pacientes internados neste Hospital, pois não fere nenhum direito, não causa prejuízo ao tratamento e a Assistência Hospitalar dos mesmo.

Fortaleza, 17 de fevereiro de 1994.

COMISSÃO DE ÉTICA

- 1- Maria Airtes Vieira Vitoriano Maria Airtes Vieira Vitoriano
- 2- Luiz Alberto de Figueiredo Luiz Alberto de Figueiredo
- 3- Messias Barbosa Lima Messias Barbosa Lima
- 4- Marcia Gonçalves Brasil Marcia Gonçalves Brasil
- 5- Fátima M^a. Fernandes Veras Fátima M. Fernandes Veras

ANEXO N.º 02

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS
DIVISÃO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

ESTUDO DE PERMEABILIDADE INTESTINAL

A. Dados Demográficos

Reg.HSJ _____
1. Nome : _____
3. Data nasc.: /____/____/____
5. Data da visita : /____/____/____

Ficha n.º _____

2. Sexo : (M/F)
4. Idade : _____

B. Informação Clínica-Nutricional

1. Diarréia (aquosa - muco - sangue)

Tempo : ____ d

2. Vômitos

3. Febre (> 37,8°C)

4. Desidratação

5. Cólicas

6. Dor abdominal

7. Câibras

8. Peso : ____ (Kg)

9. Altura ____ (m)

10. Outros (especificar) : _____

SIM

NÃO

C. Dados Laboratoriais

1. Sol. Lactulose/Manitol

Horário : _____

2. Coleta de Urina

Início : _____

Final : _____

Total : _____

3. Taxa de Excreção

Lactulose : _____

Manitol : _____

Razão L/M: _____

4. Amostra de Fezes

Coleta ____ (h)

Resultado : _____

ANEXO N.º 03

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO
SOBRE ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E DIARRÉIA
NA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ADQUIRIDA (AIDS)**

**Convidamos você ou seu filho menor _____, portador da
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a participar de um estudo sobre alterações
da permeabilidade intestinal em doenças diarreicas.**

**Você (ou seu filho) tomará em jejum, uma solução contendo dois açúcares de prova
(lactulose e manitol); em seguida sua urina será colhida durante cinco horas e enviada ao
laboratório para dosagem destes açúcares.**

**Amostras de fezes serão colhidas e também enviadas ao laboratório para pesquisa de
agentes patogênicos e tratamento específico.**

**Manteremos sigilo de sua identidade e dos resultados dos seus exames para qualquer
pessoa alheia à pesquisa. Você entretanto, não receberá qualquer pagamento por sua livre
participação como voluntário neste projeto.**

**Sua recusa em participar do estudo ou dele se afastar a qualquer época, será sempre
respeitada, e de forma alguma poderá acarretar prejuízos na assistência médica que lhe é
devida.**

Fortaleza, _____ de _____ de 1994

Paciente (responsável)

**Angela Maria Rodrigues Gifoni
(Autora)**