

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares 

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Epidemiologia e estudo dos fatores responsáveis pela espongiose ocular
no município de Araguatins - TO.**

SILVIO CARNEIRO DA CUNHA FILHO

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Prof^a Dra. Nanci do Nascimento

SÃO PAULO

2010

Dedico este trabalho

*A Eva, minha esposa, fonte de inspiração para tudo na minha vida,
companheira em todas as horas e meu grande amor.*

*Aos meus filhos Ester, Judá e Benjamim. A vida seria
extremamente vazia sem a presença de vocês.*

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, a Deus, por me presentear com um período de vida tão maravilhoso durante o qual pude conhecer pessoas especiais, que me levaram a pensar e olhar de forma diferente, a não aceitar um fracasso como um evento que não pode ocorrer, mas apenas como uma etapa para se chegar ao fim. Por esses e tantos outros motivos, a Ele todo o agradecimento que meu coração pode expressar.

A minha amada esposa, Eva. Seu sorriso sempre ilumina a minha mais densa nuvem de tristeza e abatimento. Suas palavras de incentivo sempre me deram forças. Sua compreensão pelas minhas escolhas, sua dedicação ímpar a nossa família, a paciência de colocar meus projetos acima dos seus é que me permitiram chegar hoje onde estou. Sendo uma mulher virtuosa, o seu valor, para mim, muito excede ao de jóias preciosas.

Aos meus filhos queridos, Ester, Judá e Benjamim, motivos de saudade extrema quando estão distantes e de alegria e orgulho quando estão alegremente conversando ao meu redor, tocando guitarra, bateria ou piano. Olhar para vocês me fez encontrar forças a cada momento, pois os filhos são herança do Senhor, e o fruto do ventre o seu galardão.

Aos meus pais, Silvio e Wilma, pois apesar de tão distantes, estão presente em cada momento de meus dias, através dos ensinamentos de vida que nunca serão esquecidos. Se hoje cheguei até aqui, é porque os ombros dos gigantes onde apoiei meus pés são os de vocês dois. Muito mais que um DNA, vocês deixaram em mim marcas de hombridade que nunca se apagarão.

Aos meus irmãos, Mônica (MX), Isabel (Belzinha) e Carlos Alberto (Carlim). Suas risadas e brincadeiras nos momentos de indecisão foram como colírio para os meus olhos cansados. Se as palavras de incentivo não funcionavam, uns gritos bem dados resolviam tudo. Com certeza, vocês são os irmãos que todos gostariam de ter.

A Dra. Nanci do Nascimento, minha orientadora. Existem muitas pessoas que nascem para serem pintoras. Pintam bem, sabem misturar as cores, entendem de perspectiva e param por aí. Poucas pessoas nascem para ser um Michelangelo. Dominar a arte da pintura em seus mínimos detalhes, saber fazer sua obra falar com aquele que está olhando, criar quadros que ficam na memória. Essas são as pessoas especiais, agraciadas com um dom que as torna diferentes das demais. Essa é a minha orientadora, a quem agradeço por me ensinar com toda paciência possível. Pra mim foi um privilégio poder estudar com Dra. Nanci “Michelangelo” Nascimento.

A Dr^a Olga, que me apresentou pela primeira vez a um laboratório de cultura celular e que teve uma paciência nipônica para ouvir todos os meus questionamentos básicos.

Ao Dr. Patrick Spencer, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Dr. Heitor, pelas orientações pertinentes e comentários esclarecedores. Suas observações nos instigam a não aceitar que já está tudo resolvido e que podemos sempre conseguir algo a mais. Um exemplo de pesquisador apaixonado pelo que faz.

A Fabiana e Tatiana, ou melhor dizendo, as meninas super poderosas. Ambas me receberam muito bem e literalmente, pegaram na minha mão para me mostrar o dia a dia de um laboratório de cultura celular.

Ao Rodrigo, Karina e Tamara pela camaradagem nos momentos mais críticos dos experimentos.

À Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT/TO) pela oportunidade de participar do convênio FMT/IPEN.

Aos colegas Adriane, Herbert, Eric, Paulo, Fernanda, Anelise, Bruno e todos os quem convivi na FMT/TO pelo incentivo desde o início.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela grande estímulo à formação de conhecimento em parcerias, transmitindo o saber técnico que detém.

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra, nem indústria, nem ciência, nem sabedoria alguma.

Eclesiastes 9: 10

Epidemiologia e estudo dos fatores responsáveis pela espongiose ocular no município de Araguatins – TO

SILVIO CARNEIRO DA CUNHA FILHO

RESUMO

Em outubro de 2005 a notificação de 17 casos de doença ocular de etiologia desconhecida, envolvendo, em sua maioria, a população infantil da cidade de Araguatins/TO, levou as autoridades locais a pedirem ajuda a Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Tocantins no intuito de descobrirem sua etiologia, tratamento e prevenção.

Nos pacientes acometidos, os sinais freqüentemente observados foram: intensa hiperemia conjutival, granuloma, episclerite, infiltrado corneano periférico.

Na anamnese realizada nos pacientes foi observado que todos tiveram contato com as águas do Rio Araguaia. Os resultados obtidos a partir do processamento das amostras de água, sedimentos e substratos particularmente na vegetação marginal inundada, permitiram confirmar a hipótese de que deveria haver uma fauna rica de esponjas no Araguaia, no trecho fronteiro à cidade de Araguatins

A presença intraocular de espícula de esponja de água doce das espécies *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicela* foi confirmada em material avaliado histopatologicamente proveniente de três pacientes que haviam sido submetidos a lensectomia, sugerindo que “espículas de água doce poderiam ser um surpreendente novo agente etiológico de patologia ocular”.

Assim, neste estudo foram realizados ensaios de citotoxicidade com amostras de duas espécies de esponjas coletadas no local. Os resultados indicam que os extratos das esponjas após filtração em filtro Millipore 0,45 µm continuaram apresentando atividade citotóxica, sugerindo haver um componente SOLÚVEL, e não somente espículas, capaz de induzir morte celular na população de células utilizadas.

Os indivíduos acometidos foram na maioria do sexo masculino com idade entre 05 e 14 anos.

Epidemiology and study of the factors responsible for spongiosis ocular in the city of Araguatins – TO

SILVIO CARNEIRO DA CUNHA FILHO

SUMMARY

In October 2005 the notification of 17 cases of eyes' disease of unknown etiology, involving, in its majority, the infant population of the city of Araguatins/TO, led the local authorities to ask help to the Secretariate of State of Health of the State of Tocantins in order to discover their etiology, treatment and prevention.

In affected patients, the signs frequently observed were: intense hyperemia conjutival, granuloma, episclerite, peripheral cornea infiltrated. In the anamnesis performed in patients was observed that all of them had contact with the waters of the Araguaia river.

The results obtained from processing samples of water, sediments and substrates particularly in the vegetation marginal flooded, allowed confirming the hypothesis that there should be a rich fauna sponges in Araguaia, close to the city of Araguatins

The presence of spicula of intraocular sponge species of freshwater *Drulia uruguayensis* and *Oncosclera navicela* was confirmed in material evaluated histopathologically from three patients who had undergone lensectomy, suggesting that "spikes freshwater could be a surprising new etiologic agent of pathology ocular". Thus, in this study was performed cytotoxicity assays with samples from two species of sponges collected in place. The results indicate that the extracts of sponges after filtration Millipore 0.45 µm continued presenting cytotoxic activity, suggesting there is a SOLUBLE component, and not only spikes, capable of inducing cellular death in the population of cells used. The individuals affected were the majority of males aged between 05 and 14 years.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Araguatins	4
1.2 Esponjas	6
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Material	11
3.2 Métodos	11
3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	11
3.2.2 Teste de citotoxicidade	12
3.2.2.1 Preparo do extrato de esponja	12
3.2.3.2 Manutenção das células	13
3.2.3.3 Preparação dos extratos	13
3.2.3.4 Avaliação de citotoxicidade	15
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1 –	Leucoma	1
FIGURA 2 –	Granuloma	1
FIGURA 3 –	Hiperemia conjuntival	2
FIGURA 4 –	Leucoma total	2
FIGURA 5 –	Localização de Araguaína	4
FIGURA 6	Região portuária de Araguatins	5
FIGURA 7 –	Praias Fluviais de Araguatins	5
FIGURA 8A –	Espículas silicosas em material intra ocular	8
FIGURA 8B –	Espículas silicosas em material intra ocular	9
FIGURA 8C –	Espículas silicosas em material intra ocular	9
FIGURA 9 –	Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja <i>Drulia uruguayensis</i> em coluna Resource Q.	
FIGURA 10 –	Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja <i>Oncosclera navicella</i> em coluna Resource S.	
FIGURA 11 –	Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja <i>Oncosclera navicella</i> em coluna Resource S.	
FIGURA 12 –	Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja <i>Oncosclera navicella</i> em coluna Resource S.	21
FIGURA 13 –	Medida da absorvância dos picos observados na amostra de <i>Drulia uruguayensis</i> submetida a CLAE, com coluna Resource Q.	21
FIGURA 14 –	Medida da absorvância dos picos observados na amostra de <i>Drulia uruguayensis</i> submetida a CLAE, com coluna Resource S.	22
FIGURA 15 –	Medida da absorvância dos picos observados na amostra de <i>Oncosclera navicella</i> submetida a CLAE, com coluna Resource S.	22
FIGURA 16 –	Curvas de citotoxicidade dos extratos brutos das	23

poríferas *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella*

FIGURA 17 –	Curvas de citotoxicidade do extrato bruto da poríferas <i>Drulia uruguayensi</i> submetida a irradiação.	24
FIGURA 18 –	Curva de citotoxicidade do extrato bruto da poríferas <i>Oncosclera navicella</i> submetida a irradiação.	25
FIGURA 19 –	IC50% do pico 1 do extrato purificado da <i>Drulia</i> .	26
FIGURA 20 –	IC50% do pico 2 do extrato purificado da <i>Drulia</i> .	26
FIGURA 21 –	IC50% do pico 3 do extrato purificado da <i>Drulia</i> .	27
FIGURA 22 –	Sinais e Sintomas específicos da Doença Ocular de Etiologia Desconhecida em pacientes examinados nos anos de 2006 e 2007.	28
FIGURA 23 –	Número de casos registrados anualmente.	29
FIGURA 24 –	Número de casos de DOED por mês nos anos de 2006 e 2007.	30
FIGURA 25 –	Coeficiente de incidência anual da DOED entre os anos de 2002 e 2007 no município de Araguatins/TO.	31
FIGURA 26 –	Cálculo da incidência da DOED mês a mês no ano de 2006.	32
FIGURA 27 –	Cálculo da incidência da DOED mês a mês no ano de 2007.	32
FIGURA 28 –	Percentual de pacientes com DOED por faixa etária nos anos de 2006 e 2007.	33
FIGURA 29 –	Percentual de casos de acordo com o sexo dos pacientes no período de janeiro/2006 a dezembro/2007	34

1 – Introdução

Em 26 de outubro de 2005 a notificação de 17 casos de doença ocular de etiologia desconhecida, envolvendo, em sua maioria, a população infantil da cidade de Araguatins/TO, levou as autoridades locais a pedirem ajuda à Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Tocantins (SESAU – TO) no intuito de descobrirem sua etiologia, tratamento e prevenção (Volkmer-Ribeiro & Batista, 2006 a).

Nos pacientes acometidos, os sinais frequentemente observados foram: intensa hiperemia conjuntival, nódulo conjuntival, episclerite e infiltrado corneano periférico. Os casos graves apresentavam invasão da câmara anterior pelo nódulo, sinéquia anterior e/ou posterior, catarata e opacidade corneana (Volkmer-Ribeiro & Batista, 2006 a).

Exemplos das lesões observadas estão ilustrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.



Figura 1: Leucoma



Figura 2: Nódulo conjuntival



Figura 3: Hiperemia conjuntival



Figura 4: Leucoma total

Em 08 de novembro de 2005, a Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde (SVS – MS¹) enviou equipes para realizarem ações de investigação epidemiológica. Foram examinados, durante a busca ativa, 5.084 alunos de 40 das 41 escolas de ensino fundamental (área urbana e rural) de Araguatins. Os alunos examinados correspondem a 83% da faixa etária entre cinco e 15 anos na população do município. Foram identificados 235 casos suspeitos de doença ocular, que tinham como característica o paciente ser residente ou visitante de Araguatins e região, que apresentasse nódulo conjuntival ou opacidade corneana associado ou não a hiperemia ocular (Tabela 1).

¹

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivospdf/boletim_eletronico_06_06_novo.pdf

Dos 235 casos suspeitos, 210 compareceram ao exame oftalmológico no Hospital de Referência de Augustinópolis, sendo 64 deles classificados como pacientes-caso; 85, como pacientes com seqüela e 61 não se enquadravam nos critérios utilizados para classificação. Os 17 casos notificados inicialmente foram classificados como pacientes-caso totalizando, no final de novembro de 2005, 81 pacientes-caso (Volkmer-Ribeiro & Batista, 2006 a; Boletim Eletrônico do Ministério da Saúde Ano 06 – Nº 06)

Tabela 1 – Distribuição de pacientes encaminhados para avaliação durante a busca ativa no município de Araguaína - TO.

	Nº DE PACIENTES	%
PACIENTES CASO*	64	31
PACIENTES COM SEQUELA**	85	40
NÃO SE ENQUADRAVAM NOS CRITÉRIOS	61	29
TOTAL	210	100

*Nódulo conjuntival simples ou límbico, opacidade corneana com inflamação ou granuloma de câmara anterior

**Opacidade corneana, não está em tratamento

Na anamnese foi constatado que todos os pacientes tiveram contato com as águas do Rio Araguaia, que margeia a cidade e é utilizado pelos moradores para tomar banho e lavar roupas. O Araguaia também é um ponto turístico, fazendo com que Araguaína seja visitada anualmente por centenas de pessoas na época de baixa do rio, devido às praias que se formam às suas margens.

Como o contato com as águas do rio foi um fator em comum entre os pacientes examinados, imediatamente o SVS – MS² orientou para que a população não utilizasse aquelas águas.

² http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_araguaína_1801.pdf

Entre os dias 15 e 21/02/2006 foi realizada amostragem de água e sedimentos no rio e na estação de tratamento de água, visando detectar ocorrência de espículas das esponjas. Os resultados obtidos a partir do processamento das amostras de água, sedimentos e substratos, particularmente na vegetação marginal inundada, permitiram confirmar a hipótese de que haveria uma fauna rica de esponjas no Araguaia, no trecho fronteiro à cidade de Araguatins. Este levantamento permitiu que fossem registradas 10 espécies de esponjas de água doce pertencentes a três famílias (Wolkmer-Ribeiro & Batista, 2007).

O fator intrigante no caso de Araguatins não vem a ser propriamente a atribuição do surto da doença ocular ao cauxí (águas ricas em espículas de esponjas que formam uma espuma), já que os banhistas mergulharam no rio de olhos abertos, mas sim a quantidade de espículas em suspensão nas águas de um rio com o fluxo do Araguaia mesmo na estação de águas baixas (Volkmer-Ribeiro & Batista, 2006; Volkmer-Ribeiro & Batista 2007).

1.1 Araguatins

A cidade de Araguatins, no extremo Norte do Estado, fica a 621 km da Capital (Figura 5).



Figura 5: Localização de Araguatins

A área do Município é de 2.991 Km², dos quais cerca de 7 Km² de área urbana e de 2.984 Km² de zona rural. A população de Araguaatins é de aproximadamente 26.000 habitantes³. No município, o Rio Araguaia está margeado por rica fauna e flora. Em sua extensão, ao longo do município, estão distribuídas 24 praias e um número incontável de pequenas ilhas, onde se alternam grandes porções de areia e vegetação, propícias à prática de camping (Figura 6).

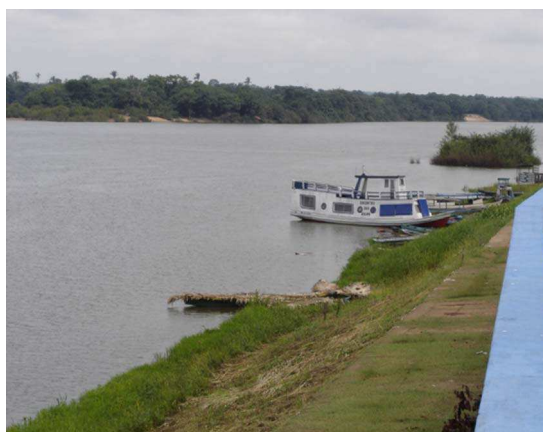


Figura 6: Região portuária de Araguaatins

Todos os anos é montada uma estrutura com barracas comerciais e de camping, banheiros químicos e postos policiais e de saúde, na praia da Ponta, a mais central das ilhas (Figura 7).



Figura 7: Praias Fluviais de Araguaatins

³ http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2009/POP2009_DOU.pdf

A economia, de acordo com o IBGE⁴, é apoiada na agricultura, basicamente de subsistência, e pecuária. Extrativismo vegetal, ainda, é praticado por um número pequeno de familiares, na exploração de coco de babaçu. A atividade comercial é o forte da economia do Município, contrária à da indústria, que está se estruturando. Com relação ao turismo, a cidade detém um enorme potencial. Banhada pelo Rio Araguaia, recebe no período de verão um número expressivo de turistas. Oriundos do sul do Maranhão e do Pará, de Brasília e de Goiânia, os banhistas de diversas localidades do País se deslocam para as praias dessa cidade.

1.2 As esponjas

As esponjas são animais aquáticos que geram, através de seu corpo, uma corrente unidirecional de água, da qual se nutrem e por intermédio da qual se reproduzem. Das cerca de 5000 espécies conhecidas, apenas 149 são de água doce, sendo 44 espécies encontradas nos rios do Brasil (Biota)⁵.

O nome do filo está relacionado com o grande número de poros presentes no organismo - Pori = poros; phoros = transportador. Esses poros comunicam o meio externo com uma cavidade das esponjas, chamada átrio ou espongiocelo, uma vez que as esponjas não apresentam órgãos, cabeça, boca ou cavidade gástrica. Sua estrutura corporal está organizada num sistema de canais e câmaras por onde circula a água. As esponjas são organismos sésseis, filtradores que, além de indicarem condições de boa oxigenação das águas, contribuem para purificação das mesmas, mostrando altos níveis de retenção de material particulado, especialmente bactérias, que constituem seu item alimentar primordial (Simpson, 1984).

As esponjas de água doce, todas da Classe Demospongiae, têm como característica básica a produção de um esqueleto de espículas de Óxido de Sílica, em forma de Opala, isto é, não cristalina. Essas espículas, devido à sua constituição mineral, após a morte e putrefação das esponjas, são liberadas da matriz de colágeno, que as mantém unidas e, assim permanecem nos sedimentos, disponíveis para entrarem em suspensão no meio líquido, com qualquer movimento das águas. Assim, a produção dessas esponjas e a

⁴ <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=170220#>

⁵ <http://www.biota.org.br/pdf/v4cap01.pdf>

correspondente liberação de suas espículas em ambientes de fluxo contínuo, como os rios certamente serão muito maiores (Volkmer-Ribeiro & Batista, I Relatório Técnico).

As esponjas em questão têm um esqueleto espinhoso, composto de espículas que as tornam mais resistentes e que, uma vez dispersas na água, podem penetrar na pele, em tecidos conjuntivos e mucosas (olhos, boca, nariz e tubo digestivo) de pessoas e animais que entrem em contato com a água do rio.

Antigas tribos indígenas que ocuparam a região já conheciam o perigo representado pelas esponjas em épocas de seca do rio, quando elas ficam expostas ao ar, secam e liberam as espículas. As águas ricas em espículas formavam uma espuma que os índios chamavam de cauí ou cauxi.

Os relatos de sintomas relacionados com o contato de pessoas com as esponjas de água doce podem datar da época pré-colombiana, segundo alguns arqueólogos. Os indígenas conhecem bem os sintomas dermatológicos (prurido e hiperemia) decorrentes de banhos nas chamadas lagoas da coceira.

Da Matta (1937) registra: “Ora, porque o sagaz e astuto caboclo, ou o nordestino observador já identificado com o meio amazonense, não entra em rio que tenha cauxi, nelle não se banha e não bebe a agua dahi retirada? Porque o selvicola atravez de gerações ensinou a cada qual que “i cai tara” isto é, “elle se queima nagua” ou “a agua lhe queima!”. E com propriedade tão irritante para a epiderme, mais pronunciada ainda ella se torna quando a água ingerida, porque a inflamação da mucosa gastro intestinal poderá por vezes apresentar symptomas alarmantes. Por tal motivo o selvícola dizia: - cai iguare, isto é, queima, bebedor d’água”. Brazil (1938) relata: “Este estudo visou não só levantar as dúvidas sobre a questão controvertida do caucy, no Amazonas, como estabelecer conclusões práticas e úteis. A primeira consequência a tirar dessas observações vem a ser a necessidade de uma filtragem da água para a alimentação e para o banho. A ingestão da água sem filtrar, pode comprometer o aparelho digestivo, provocando irritações traumáticas das mucosas, que repetidas podem determinar o câncer de forma experimental. Os olhos são também a preservar nos mergulhos que os banhistas costumam fazer” (Biota)⁶.

Segundo Machado (1947): “Os Indígenas Carajás pulverizam as colônias de espongiárias e calcinadas previamente, ou não, adicionam à argila com que fabricam peças de sua cerâmica. As espículas determinam dermatite purulenta no tegumento

⁶<http://www.biota.org.br/pdf/v4cap01.pdf>

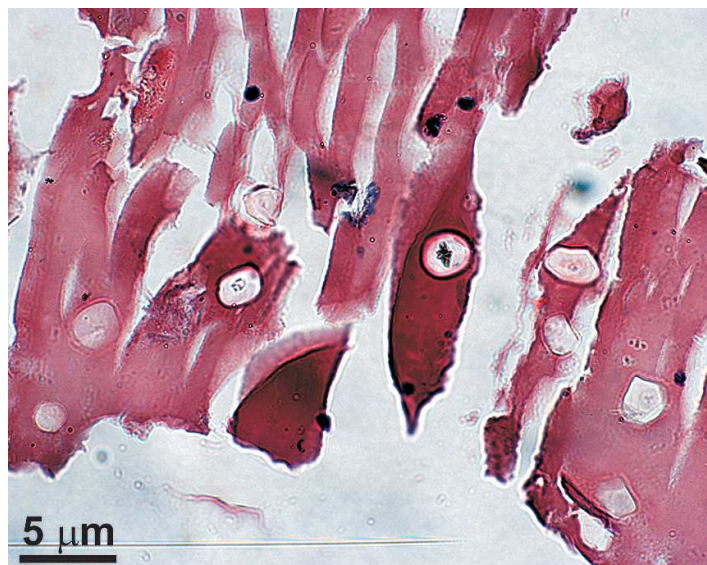
manual das oleiras”. Hilbert (1955) chama a atenção para a preferência dos caboclos pelo *caripé* (argila mista com cinzas de tecidos vegetais pertencentes à licania, uma rosácea) ao invés do cauxí. Os motivos por essa escolha estavam relacionados com os inchamentos das mãos causadas pelo cauxí e, ainda, porque os utensílios de cozinha fabricados com esse material causavam desarranjos estomacais (Porífera Brasil)⁷.

Deve-se destacar que a bibliografia nacional (Haddad Jr, 2003) e internacional (Thomas & Scott, 1997) dedicada a peçonhas de origem animal, seus efeitos, primeiros socorros e tratamentos médicos, não incluem, até o presente, os processos alérgicos/patológicos causados pelas esponjas de água doce do planeta, ainda que mencionem as espículas das esponjas marinhas como fatores etiológicos de alguns processos alérgicos.

A presença intraocular de espícula de esponja de água doce das espécies *Drulia uruguayensis* e *Drulia ctenosclera* foi confirmada pela primeira vez por Volkmer-Ribeiro *et al* (2006) em material avaliado histopatologicamente proveniente de três pacientes que haviam sido submetidos a lensectomia (Figuras 8A, 8B e 8C), sugerindo que “espículas de água doce poderiam ser um surpreendente novo agente etiológico de patologia ocular”, embora elas possam conter outras proteínas que podem induzir reações alérgicas e/ou inflamatórias (Vasconcelos-Santos *et al*, 2009).



⁷ <http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/2-pesquisa/pinheiros-08/pinheiros-08-p6.htm>



Figuras 8A, 8B e 8C: Espículas silicosas (gemmoscleres) da esponja de água doce *Drulia uruguayensis* misturadas com faixas eosinofílicas acelulares fragmentadas do córtex lenticular de dois pacientes.

2 Objetivos

Levantar aspectos epidemiológicos e avaliar a citotoxicidade das esponjas responsáveis pela Doença Ocular de Etiologia Desconhecida em Araguatins - TO

3 Material e Métodos

3.1 Material

- 1- As amostras de *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella* (esponjas de água doce) foram coletadas no rio Araguaia, na região que circunda a cidade de Araguatins/TO com autorização da Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins, sendo devidamente catalogadas, acondicionadas e enviadas adequadamente para o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).
- 2- Levantamento de dados da DOED junto a Secretaria de Saúde do Tocantins.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Uma amostra raspada da superfície da esponja *Drulia uruguayensis* (40 mg) foi diluída em tampão tris 25 mM, pH 8 e centrifugada a 3000 g em uma microcentrífuga (Eppendorf) por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e um volume de 1 mL foi injetado em uma coluna de troca aniônica Resource Q, conectada a um sistema HPLC (Shimadzu®), previamente equilibrada com tampão Tris 25 mM, pH 8 (Tampão A). O Tampão B era constituído por Tris 25 mM/NaCl 1M, pH 8. Após a injeção, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão B com um fluxo de 1 mL/minuto para eluição da fração não adsorvida à matriz.. A absorvância do eluato foi monitorada em 220 e 280 nm.

Uma segunda amostra de *Drulia uruguayensis* (40 mg) foi diluída em tampão PO₄, 25 mM, pH 7, centrifugada a 3000 g em uma microcentrífuga por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e um volume de 1 ml foi injetado em uma coluna de troca aniônica Resource S, conectada a um sistema HPLC (Shimadzu®), previamente

equilibrada com tampão PO_4 25 mM, pH 7 (Tampão A). O Tampão B era constituído por PO_4 25 mM/ NaCl 1M, pH 7. Após a injeção, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão B com um fluxo de 1 mL/minuto para eluição da fração não adsorvida à matriz. A absorvância do eluato foi monitorada em 220 e 280 nm.

Foi pesada também uma amostra de esponja da espécie *Oncosclera navicella* (98 mg) sendo diluída em tampão PO_4 , 25 mM, pH 7, centrifugada a 3000 g em uma microcentrífuga por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e um volume de 1 mL foi injetado em uma coluna de troca aniônica Resource S, conectada a um sistema HPLC (Shimadzu®), previamente equilibrada com tampão PO_4 25 mM, pH 7 (Tampão A). O Tampão B era constituído por PO_4 25 mM/ NaCl 1M, pH 7. Após a injeção, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão B com um fluxo de 1 mL/minuto para eluição da fração não adsorvida à matriz.. A absorvância do eluato foi monitorada em 220 e 280 nm.

As amostras correspondentes a cada pico observadas no HPLC foram então agrupadas e submetidas à análise por espectrofotômetro (Genesys 6®) para a leitura de absorvância e para se estimar a concentração de prováveis proteínas.

3.2.2 Teste de Citotoxicidade

3.2.2.1 Preparo do extrato de esponja

Cada espécie de esponja foi raspada, com espátula, em sua superfície e o produto da raspagem foi pesado em balança de precisão. Após a pesagem o material destinado aos ensaios de citotoxicidade foi submetido à esterilização por radiação gama de uma fonte de ^{60}Co em uma dose total de 25 kGy. Uma segunda amostra de *Drulia uruguayensis* foi submetida à esterilização por luz ultravioleta por 60min, em capela de fluxo laminar. Estas amostras foram colocadas em solução RPMI por 24 horas sendo a concentração final de 1mg/ml em todas as amostras. Após 24 horas foi realizada

filtração do extrato com filtro micropore de 0.45. Em seguida foram realizadas 10 diluições seriadas dos extratos a partir da concentração de 100%, onde a cada nova diluição foram acrescentados 2 mL de solução RPMI para cada 1 ml da diluição anterior, sendo a concentração final de 0,0002 mg/mL.

3.2.3.2 Manutenção das células

No teste foi utilizada uma cultura de células de uma linhagem celular de ovário de hamster chinês (ATCC CHO K1). As amostras das esponjas foram testadas em um intervalo de concentrações do extrato, e a concentração que produziu uma redução de 50% da absorção de MTS foi tomada como o parâmetro de citotoxicidade.

As células CHO-k1 foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640, adicionado com antibióticos (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL) e antifúngico (anfotericina 0,0025 µg/mL), além de 2 mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂.

Quando as células formaram uma monocamada no fundo da placa ocupando aproximadamente 90% da área de cultura (subconfluência), foram descoladas pela ação da proteína tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

3.2.3.3 Preparação dos extratos

Para a avaliação de citotoxicidade foram escolhidas duas espécies de esponjas de água doce. A *Drulia uruguayensis* e a *Oncosclera navicella*. As duas espécies são encontradas nas águas do rio Araguaia, na região que margeia a cidade. A Presença de

espículas da espécie *Drulia uruguayensis* já foi observada em análise histopatológica de material intra-ocular proveniente de 3 pacientes que apresentavam DOED. A espécie *Oncosclera navicella*, foi utilizada para avaliar se os resultados de cromatografia e citotoxicidade seriam semelhantes entre as duas espécies de esponjas.

Os extratos foram preparados a partir de 1 g de cada esponja. Os materiais foram esterilizados por radiação ultravioleta por um período de 24h. Após a esterilização, as esponjas foram adicionadas em um frasco de centrífuga de 15 mL contendo 4 mL de meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO) sem soro fetal bovino, resultando em uma solução de 250 mg/mL. O tubo foi então incubado em banho Dubnoff com agitação à temperatura de 37° C por um período de 24h. Após o período de incubação os extratos puros foram filtrados utilizando filtro de seringa de 0,45 µm e diluídos para as concentrações do teste: 50mg/mL; 12,5mg/mL; 6,0 mg/mL; 3,0 mg/mL; 2,5 mg/mL; 2,0 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,1 mg/mL. Todas as amostras estéreis foram armazenadas em freezer -20° C até o dia do ensaio.

De cada espécie de esponja também foi preparada uma amostra cujo material foi submetido à esterilização por radiação gama de uma fonte de ⁶⁰Co em uma dose total de 25 kGy. Após a irradiação as esponjas foram adicionadas em um frasco de centrífuga contendo meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO) sem soro fetal bovino, resultando em uma solução de 1 mg/mL. O tubo foi então incubado em banho Dubnoff com agitação à temperatura de 37° C, por um período de 24h. Após o período de incubação os extratos puros foram filtrados utilizando filtro de seringa de 0,45 µm e diluídos para as concentrações do teste. Todas as amostras estéreis foram armazenadas em freezer -20° C até o dia do ensaio.

3.2.3.4 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade foi preparada uma suspensão celular de células CHO a uma concentração de 60.000 cél/mL. Alíquotas de 50 µL de cada diluição do extrato foram transferidas para 4 poços de uma placa de cultura com 96 poços e 50 µL da suspensão celular foram adicionados aos poços contendo os extratos. Como controle de ensaio, 4 poços da placa foram preenchidos com 50 µL de meio RPMI-1640 sem soro, e 50 µL de suspensão celular, para indicar o 100% de viabilidade celular. As placas foram incubadas por 72h a 37° C em estufa de CO₂. Para revelar a viabilidade celular do ensaio, 20 µL de corante supravital MTS/PMS foram adicionados a cada poço. Após 2h de incubação a 37° C em estufa de CO₂, a densidade óptica dos poços foi determinada no comprimento de onda de 490 nm em uma leitora de placas.

Os reagentes empregados para a avaliação da viabilidade celular foram do CellTiter96IK1 Aqueous on - Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation). O teste CellTiter96® AQueolls é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiossensitivos, preparado com soluções de um composto tetrazólico (3 - (dimetiltiazol (4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte, MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metassulfato de fenazida. PMS) (Cory, 1991). O MTS é bioreduzido pelas células ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura tecidual. A absorvância do formazan a 490 nm pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros reagentes. A conversão do MTS em formazan solúvel aquoso é executada pela enzima desidrogenase, encontrada em células metabolicamente ativas. A quantidade do produto de formazan como medida da quantidade de absorvância a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

O índice de citotoxicidade (IC_{50}) foi estimado por interpolação, como a concentração do extrato que resulta em 50% de inibição da absorção de MTS, após a construção de um gráfico com a média de porcentagem de células vivas contra a concentração do extrato (%).

A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC (\%) = \frac{DO \text{ amostra}}{DO \text{ controle}} \times 100$$

DO controle

Onde: **VC** = viabilidade celular (%); **DO amostra** = densidade óptica da amostra; **DO controle** = densidade óptica do controle

4 Resultados

Para obtenção do material utilizado nos experimentos de cromatografia e citotoxicidade foi realizada raspagem da superfície de cada espécie de esponjas e o produto da raspagem foi pesado em balança de precisão, sendo obtido uma quantidade final de 4 gramas da espécie *Drulia uruguayensis* e 4 gramas da espécie *Oncosclera navicella*.

4.1.1 Cromatografia por HPLC

Amostras das esponjas foram submetidas a cromatografia de troca iônica e as leituras das absorvâncias foram feitas simultaneamente em dois comprimentos de ondas 220 e 280 nm, objetivando ampliar as possibilidades de detecção de analitos.

O perfil cromatográfico da *Drulia uruguayensis* em coluna Resource Q é apresentado na Figura 9.

Nesta cromatografia, apenas o pico 1 eluiu antes do início do gradiente linear tanto quando a leitura foi feita em 220 nm quanto em 280 nm. Observa-se contudo que quando a absorvância foi medida com o filtro de 220 nm, o pico é pelo menos quatro vezes maior do que aquele obtido em 280 nm.

Os três picos observados foram analisados isoladamente para avaliação de citotoxicidade.

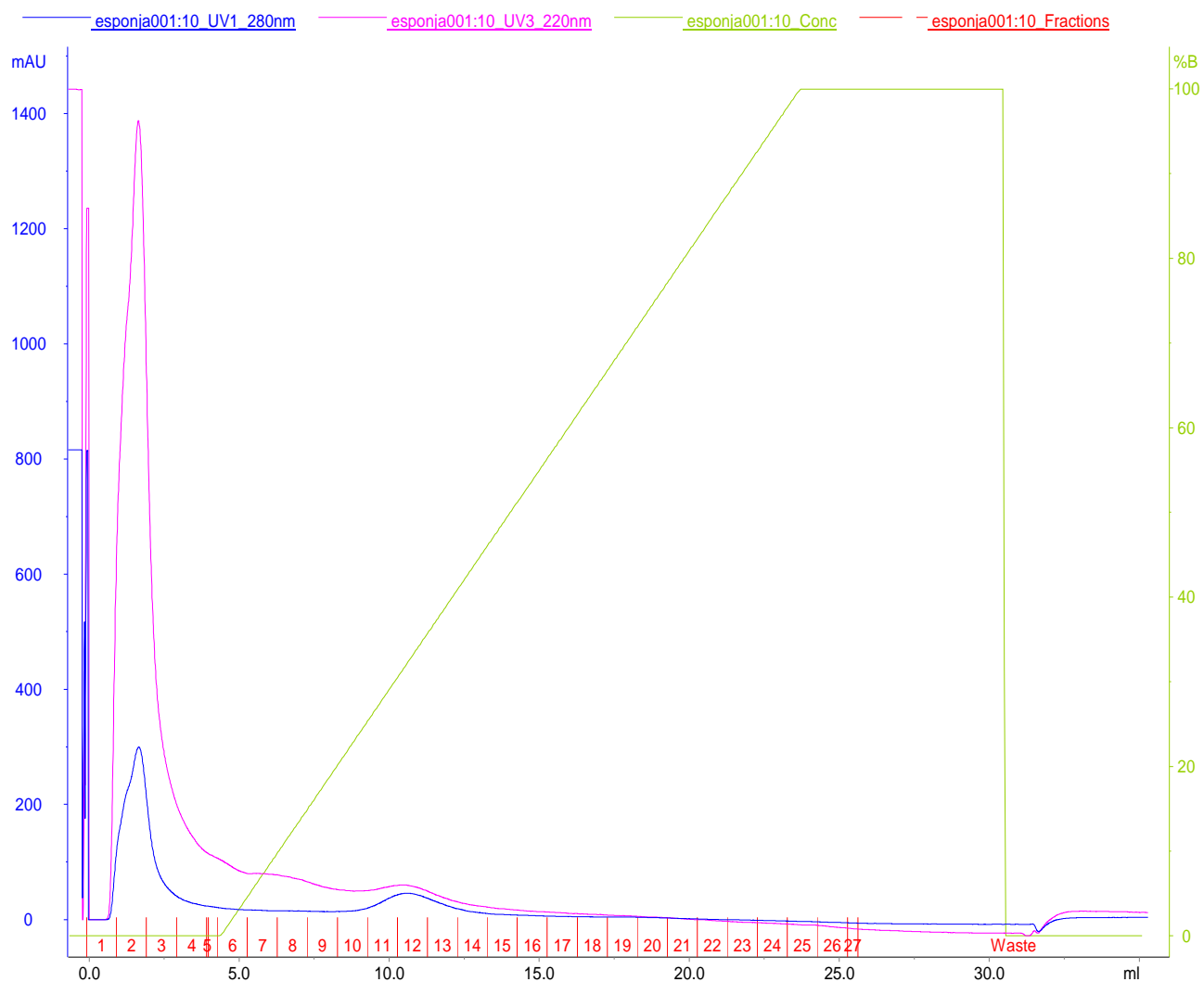


Figura 9 - Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja *Drulia uruguayensis* em coluna Resource Q. Eluída com Tampão Tris 25 mM pH 8,0 e gradiente linear de NaCl (0 a 1 M, no mesmo tempo). O Fluxo de eluição foi de 1 mL/min. Frações de 1mL. A absorvância foi medida em 220 nm (rosa) e 280 nm (azul).

O perfil cromatográfico da esponja *Drulia uruguayensis* em coluna Resource S é apresentado na Figura 10. O pico 1 eluiu antes do gradiente linear ter iniciado, enquanto o pico 2 coincide com o início do gradiente linear. A leitura feita em 220 nm mostra o primeiro pico pelo menos três vezes maior que aquele apresentado em 280 nm.

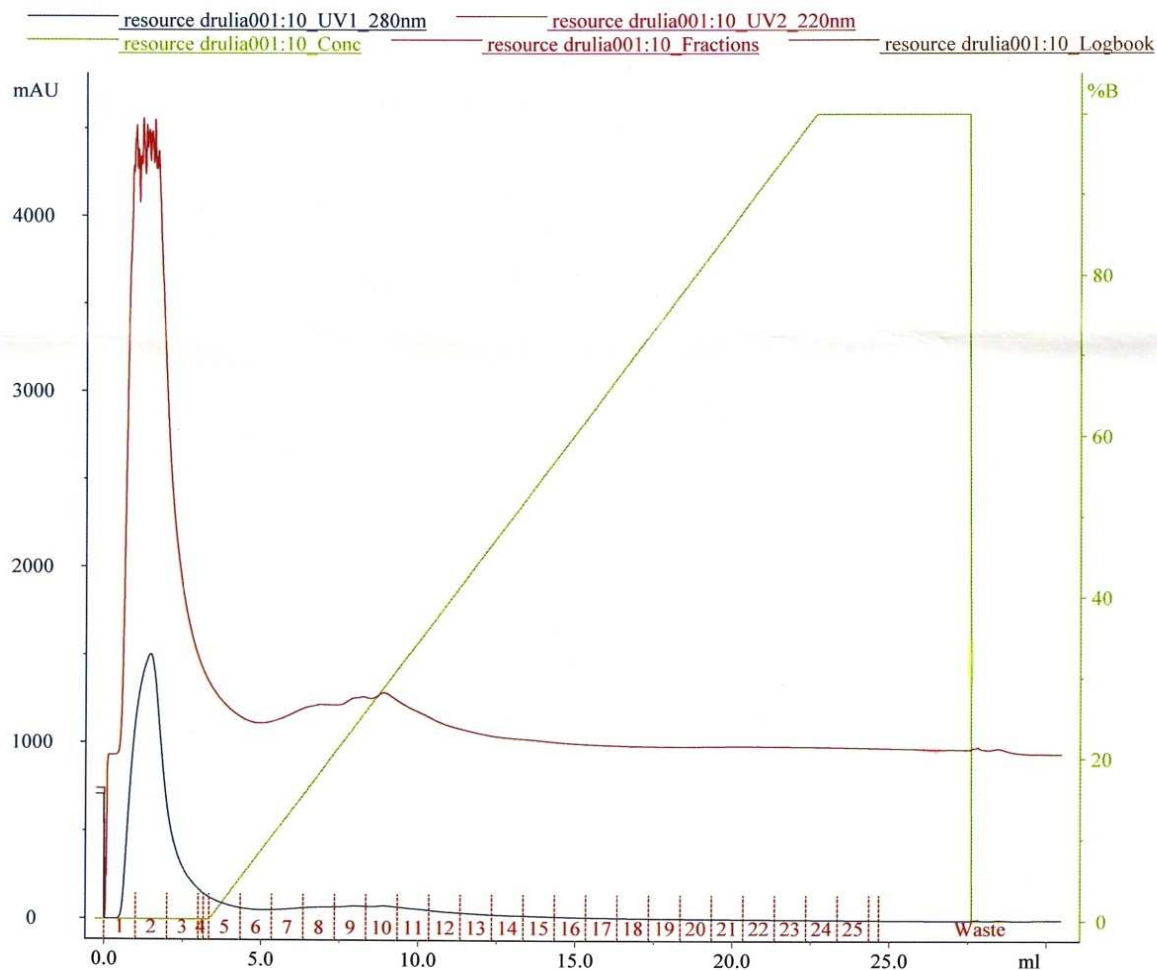


Figura 10 - Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja *Drulia uruguayensis* em coluna Resource S. Eluída com Tampão PO4 25 mM pH 7,0 e gradiente linear (0 a 1 M, no mesmo tampão). O Fluxo de eluição foi de 1 mL/min. Frações de 1 mL. A absorvância foi medida em 220 nm (vinho) e 280 nm (cinza).

As figuras 11 e 12 representam o perfil cromatográfico da *Oncosclera navicella* em coluna Resource S. Nos dois perfis pode ser observado que o pico 1 eluiu antes do gradiente linear, enquanto que o segundo pico aparece no início do gradiente.

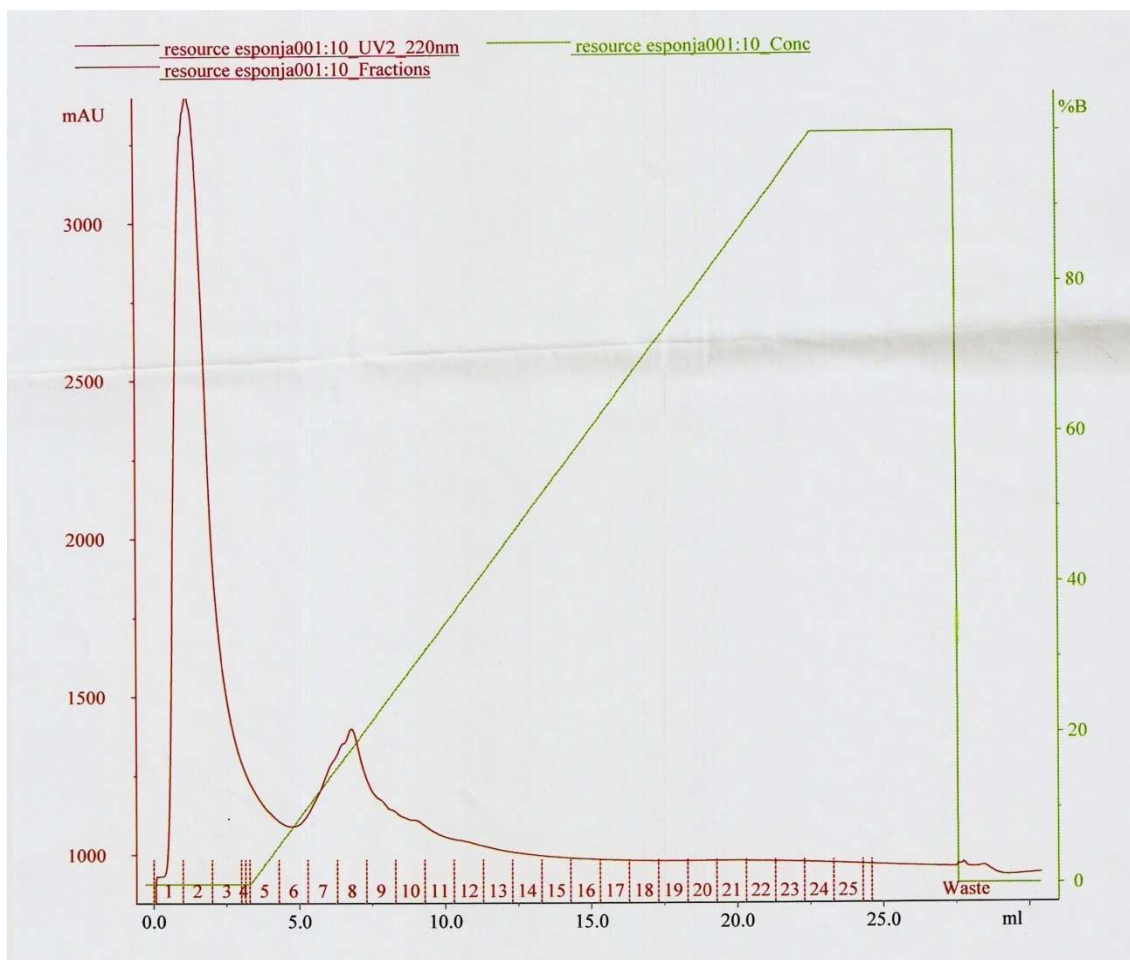


Figura 11 - Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja *Oncosclera navicella* em coluna Resource S. Eluída com Tampão PO_4 25 mM pH 7,0 e gradiente linear (0 a 1 M, no mesmo tampão). O Fluxo de eluição foi de 1 mL/min. Frações de 1 mL. A absorvância foi medida em 220 nm.

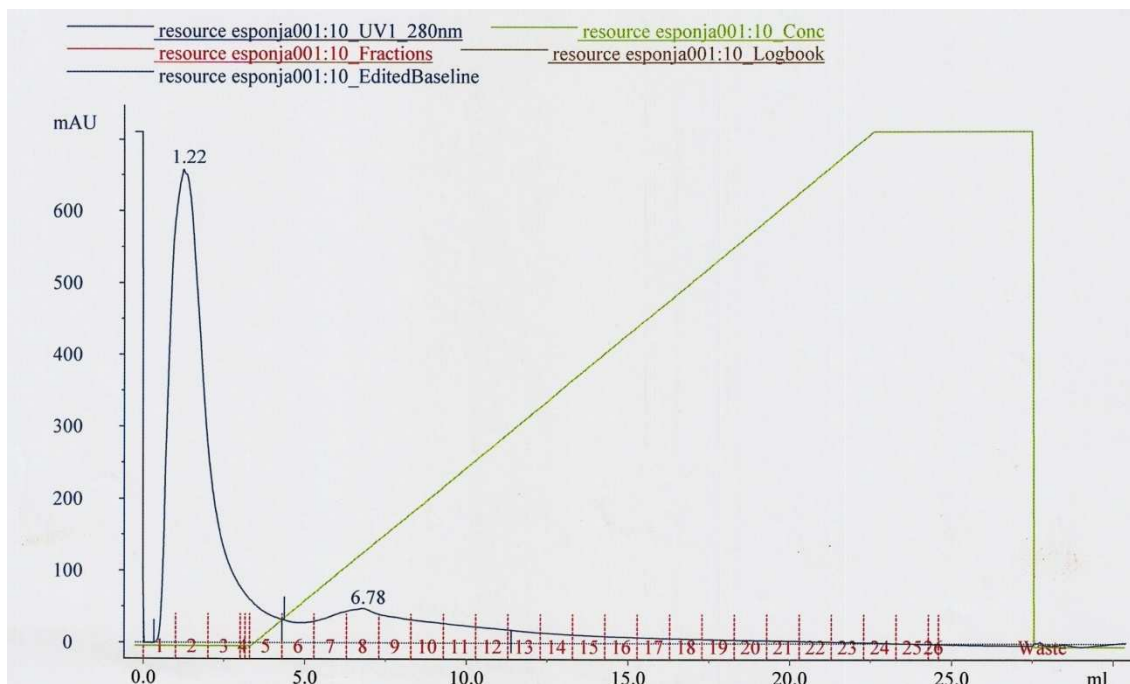


Figura 12 - Cromatografia de troca iônica do extrato bruto da esponja *Oncosclera navicella* em coluna Resource S. eluída com Tampão PO₄ 25 mM pH 7,0 e gradiente linear (0 a 1 M, no mesmo tampão). O Fluxo de eluição foi de 1 mL/min. Frações de 1 mL. A absorvância foi medida em 280 nm.

4.3 Medidas da absorvância

Após as amostras das espécies das esponjas *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella* serem submetidas a CLAE, os picos resultantes foram analisados em relação a sua absorvância utilizando-se um espectrofotômetro.

Na Figura 13 podem ser observadas as absorvâncias dos três picos obtidos pela CLAE.

<i>Drulia uruguayensis</i>	Concentração presumida
PICO 1	0,123 mg/mL
PICO 2	0,019 mg/mL
PICO 3	0,032 mg/mL

Figura 13 - Medida da absorvância dos picos observados na amostra de *Drulia uruguayensis* submetida a CLAE, com coluna Resource Q (280 nm).

<i>Drulia uruguayensis</i>	Concentração presumida
PICO 1	0,5 mg/mL
PICO 2	0,05 mg/mL

Figura 14 - Medida da absorvância dos picos observados na amostra de *Drulia uruguayensis* submetida a CLAE, com coluna Resource S (280nm).

<i>Oncosclera navicella navicella</i>	Concentração presumida
PICO 1	0,22 mg/mL
PICO 2	0,031 mg/mL

Figura 15 - Medida da absorvância dos picos observados na amostra de *Oncosclera navicella* submetida à CLAE, com coluna Resource S (280 nm).

4.1 Avaliação de citotoxicidade

4.1.1 Extrato Bruto

Os testes de citotoxicidade permitiram analisar as respostas das células frente ao extrato das esponjas sem a presença das espículas. O resultado apresentado na Figura 16 mostra a citotoxicidade apresentada pelos extratos brutos as duas espécies de esponjas estudadas.

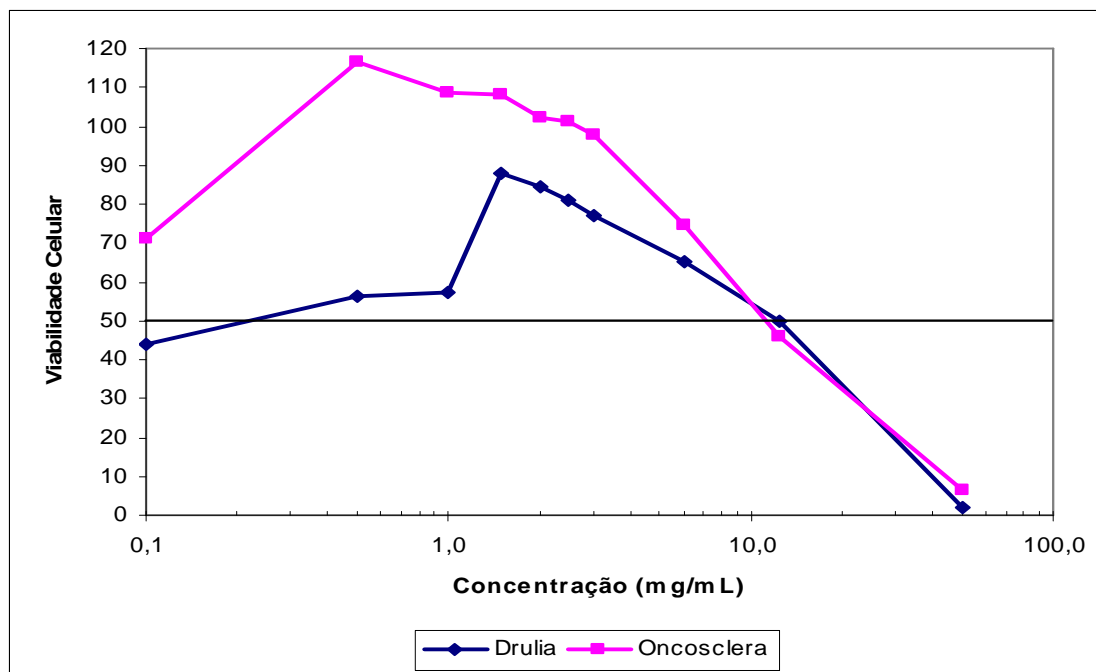


Figura 16 - Curvas de citotoxicidade dos extratos brutos das poríferas *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella*, submetidas à radiação ultravioleta.

Partindo dos extratos mais concentrados, a esponja *Drulia* apresentou um índice de citotoxicidade de 50% ($IC_{50\%}$) na concentração de 12,5 mg/mL. Entretanto, a partir do extrato com a concentração de 1,5 mg/mL, uma outra curva de citotoxicidade para as células CHO começa a aparecer, com outro índice de citotoxicidade em torno de 0,25 mg/mL.

Por outro lado, a esponja *Oncosclera navicella* com os extratos mais concentrados apresentou um $IC_{50\%}$ semelhante ao da *Drulia uruguayensis*. A partir da concentração de 0,5 mg/ml, uma outra curva aparece indicando uma citotoxicidade mais pronunciada do que a toxicidade da *Drulia*.

4.1.2 Extrato Bruto submetido à irradiação

Para assegurar a esterilidade das amostras colocadas em contato com as células durante a avaliação de citotoxicidade, foram utilizados os extratos brutos submetidos à irradiação com ^{60}Co , em dose esterilizante de 25kGy.

A incubação dos extratos irradiados com as células mostrou atividade citotóxica em ambas as amostras (Figuras 17 e 18), com a espécie *Oncosclera navicella* apresentando ação citotóxica maior que a espécie *Drulia uruguayensis*.

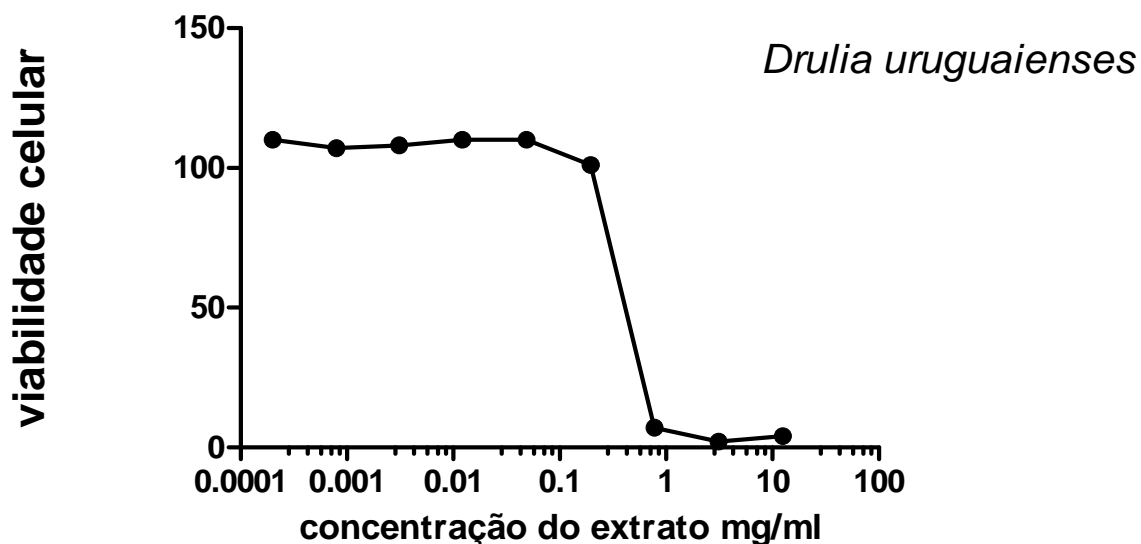


Figura 17 - Curvas de citotoxicidade do extrato bruto das poríferas *Drulia uruguayensis* submetida a irradiação com fonte de ^{60}Co , em dose total de 25 kGy.

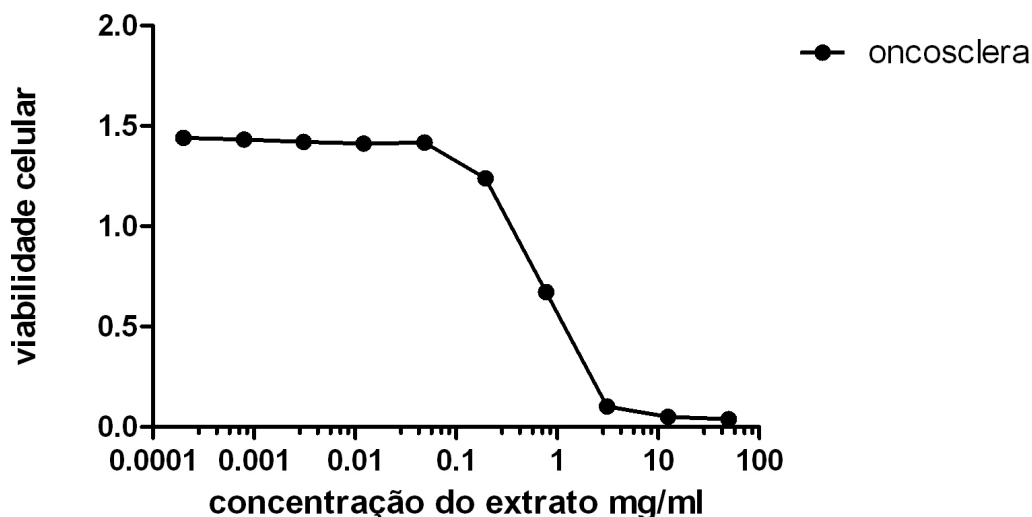


Figura 18 - Curva de citotoxicidade do extrato bruto das poríferas *Oncosclera navicella* submetida à irradiação com fonte de ^{60}Co , em dose total de 25 kGy.

4.1.3 Extrato purificado de *Drulia uruguayensis*

Na tentativa de identificar o componente da esponja responsável pela toxicidade, os ensaios foram repetidos com cada um dos picos oriundos da cromatografia.

4.1.3.1 Viabilidade celular

Nas Figuras 19, 20 e 21 são apresentadas as IC_{50} dos 3 picos do extrato purificado da *Drulia uruguayensis* observados na cromatografia com HPLC. Cada pico foi analisado em ensaios de viabilidade celular em placas separadas, utilizando-se fenol como controle positivo.

Uma aparente presença de proteínas nos picos foi analisada com espectrofotometria sendo de 0,12 mg/ml para o primeiro pico, 0,019 mg/ml para o segundo pico e 0,032 mg/ml para o terceiro pico.

Os três apresentaram atividade citotóxica semelhante entre si, sendo que o primeiro e o segundo pico apresentaram o IC_{50} aproximadamente com 88% da concentração inicial, enquanto o terceiro pico apresentou o IC_{50} com aproximadamente 82% da concentração inicial.

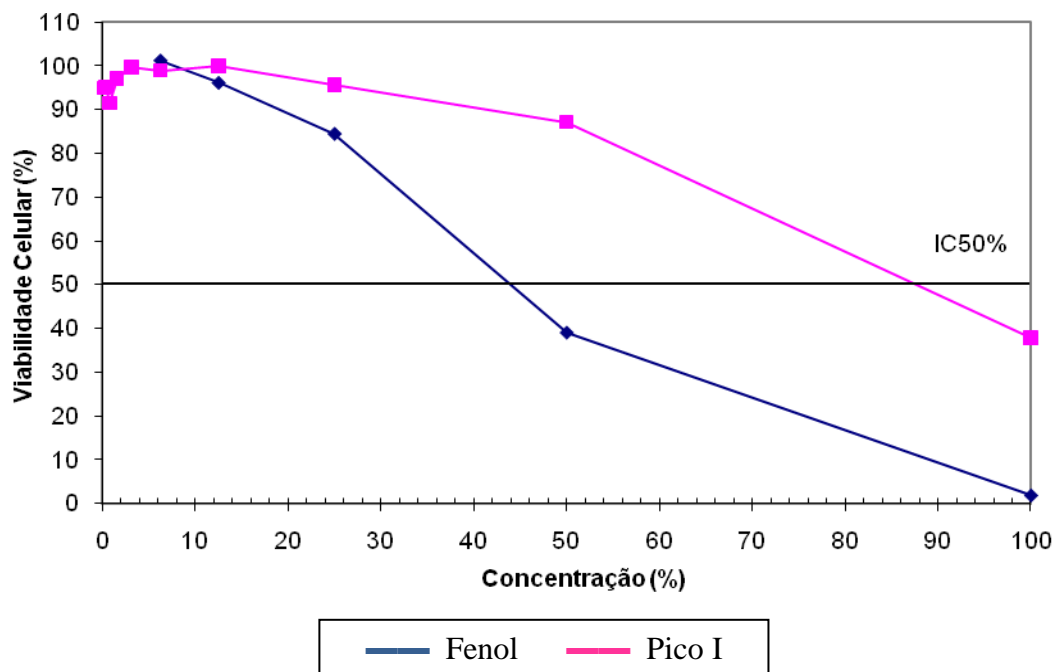


Figura 19 - IC50% do pico 1 do extrato purificado da *Drulia uruguayensis*.

Observa-se que o IC50% se encontra na faixa de 88% da concentração inicial.

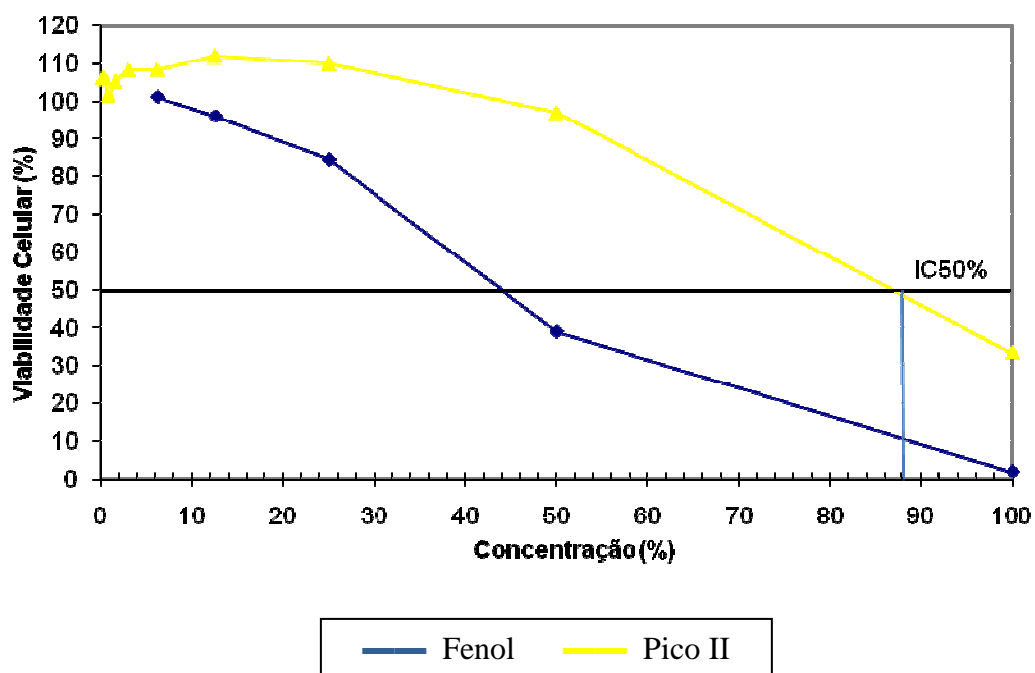


Figura 20 - IC50% do pico 2 do extrato purificado da *Drulia uruguayensis*.

Assim como a amostra coletada no pico 1, observa-se a IC₅₀ aproximadamente em 88% da concentração inicial.

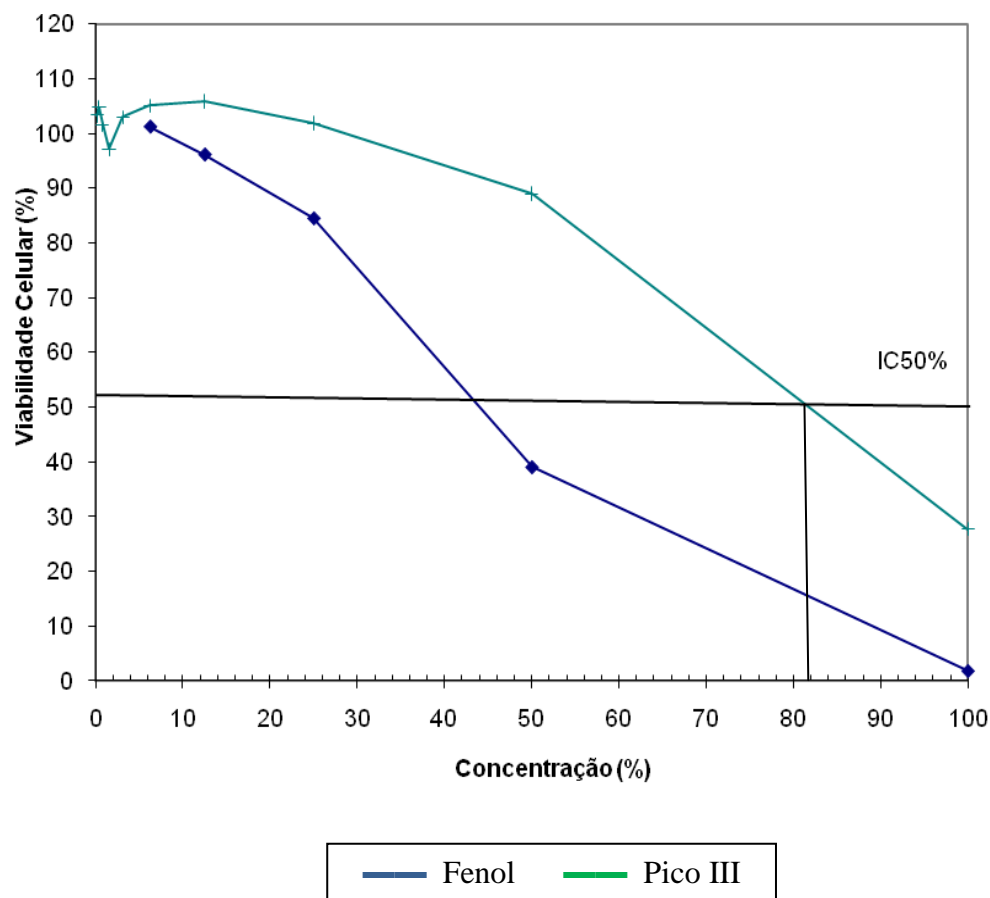


Figura 21 - IC₅₀ do pico 3 do extrato purificado da *Drulia uruguayensis*.

Observa-se que o IC₅₀ se encontra aproximadamente na faixa de 82% da concentração inicial. Em comparação com os outros dois picos, mostrou-se com maior atividade citotóxica.

4.4 Dados epidemiológicos

O quadro clínico da DOED tem sido caracterizado por alguns dos seguintes sinais: intensa hiperemia conjuntival, nódulo subconjuntival (granuloma), episclerite e infiltrado corneano periférico. Em casos graves, o nódulo invade a câmara anterior do globo ocular, podendo provocar uveíte com sinéquia anterior e/ou posterior, catarata e opacidade corneana, com risco de cegueira. A figura 22 apresenta os principais sinais da

DOED, nos pacientes examinados nos anos de 2006 e 2007. A presença de nódulo unilateral foi o sinal encontrado com maior frequência. Opacidade bilateral foi registrada apenas no ano de 2006. Já a presença de opacidade corneana unilateral foi observada tanto em 2006 quanto em 2007.

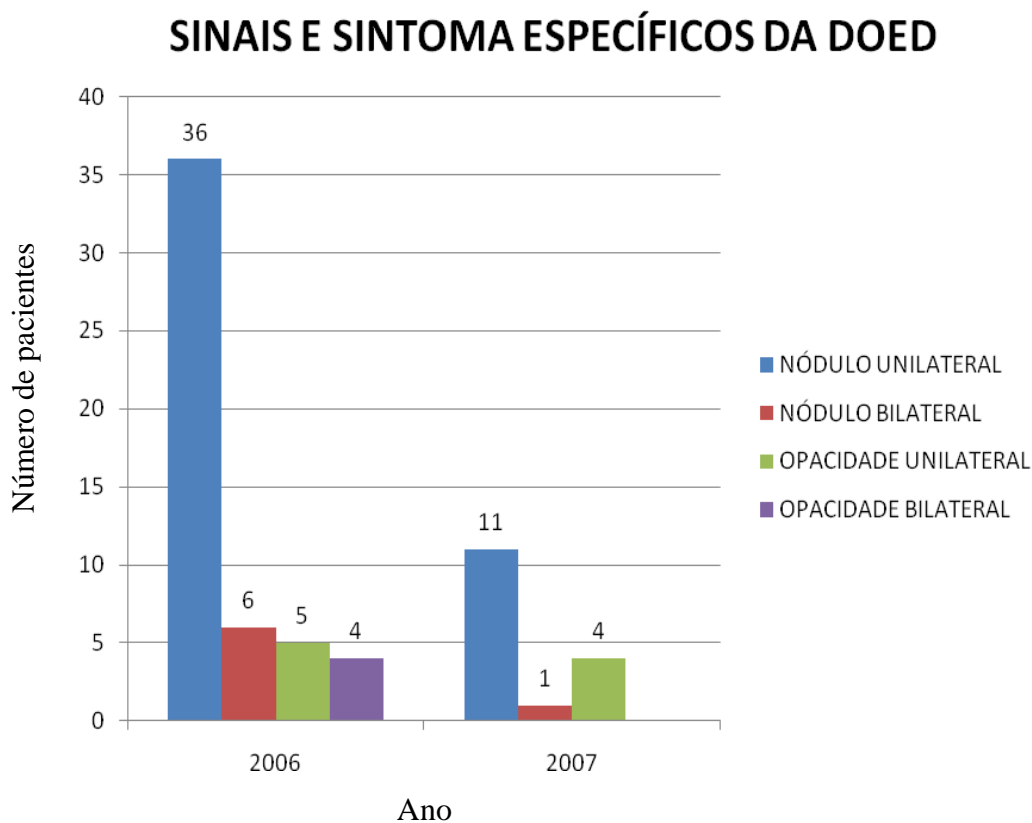


Figura 22: Sinais e Sintomas específicos da Doença Ocular de Etiologia Desconhecida em pacientes examinados nos anos de 2006 e 2007.

Na busca ativa foi possível confirmar pacientes com quadro de DOED desde o ano de 2002. De acordo com os dados coletados, nos anos seguintes o número de pacientes aumentou significativamente até o ano de 2005, quando houve 156 casos confirmados. Em 2006 e 2007 observou-se uma queda significativa no número de casos confirmados com respectivamente 90 e 35 pacientes, número esse, no entanto, bem maior que os registros referentes aos anos de 2002 a 2004 (Figura 23).

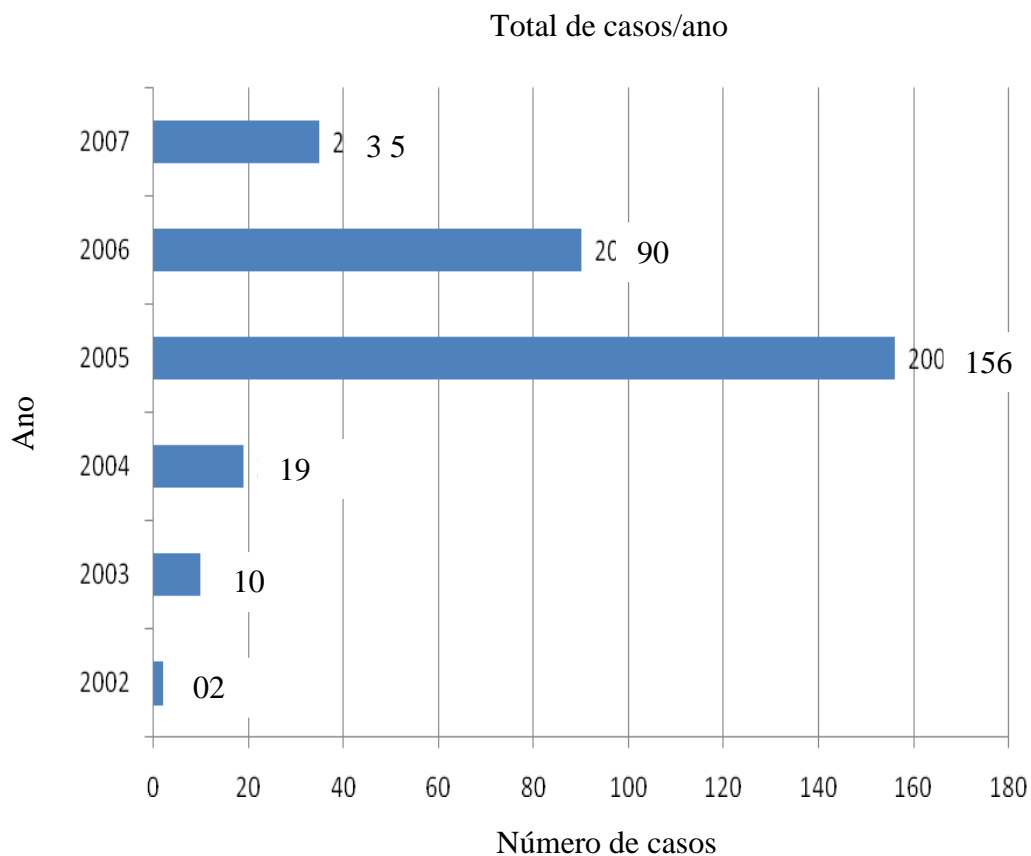


Figura 23 - Número de casos registrados anualmente. Nos anos de 2002, 2003 e 2004 foi considerada a informação do paciente acerca do início da apresentação dos sinais da DOED. O ano de 2005 apresenta uma alta incidência de casos que representam o somatório da busca ativa realizada com a demanda espontânea.

Verificando-se os registros de casos novos mês a mês nos anos de 2006 e 2007, observou-se um pico entre julho e outubro. Esses são os meses que correspondem ao período de seca do rio e às férias escolares, onde a maioria das famílias utiliza as praias do rio para acampar. Quando retiramos os dados da busca ativa realizada em 2005, a incidência da DOED segue um padrão sazonal, com aumento no número de casos entre os meses de julho e outubro bastante semelhante entre os anos avaliados (Figura 24).

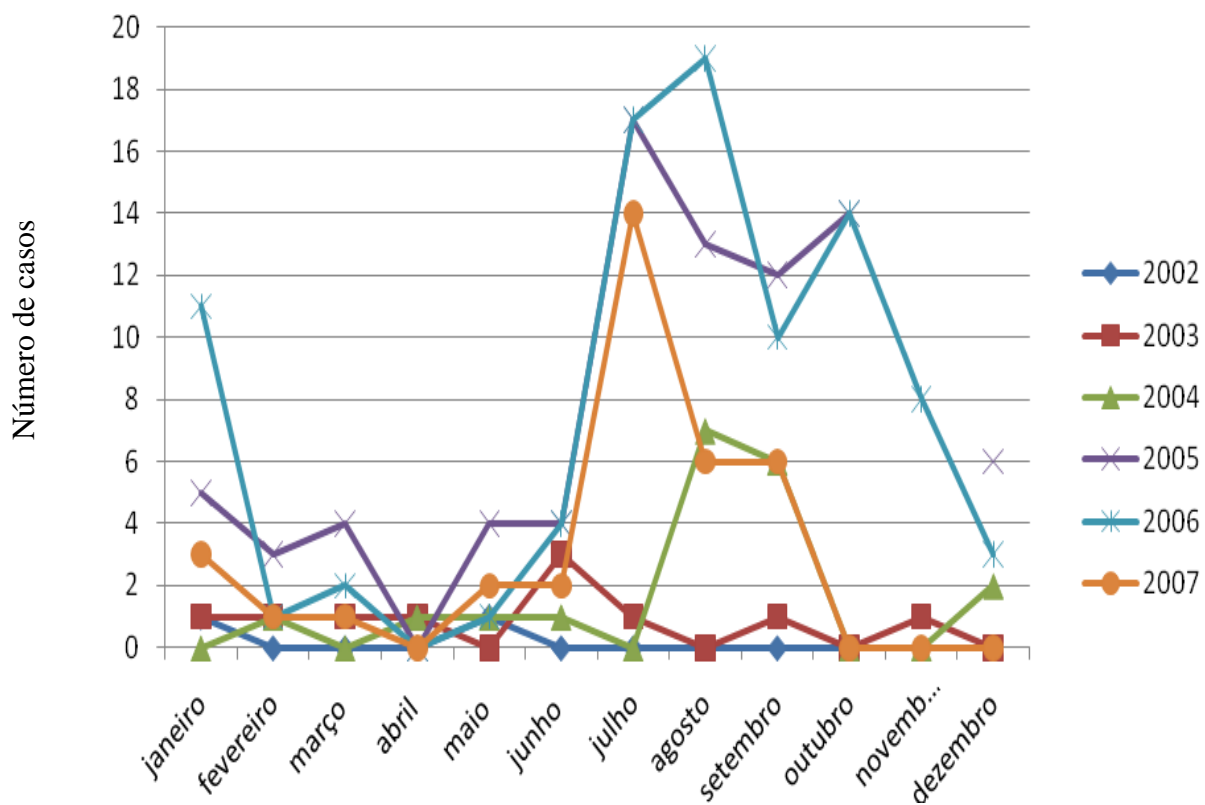


Figura 24 - Número de casos de DOED por mês nos anos de 2006 e 2007. No ano de 2005 foram retirados os dados referentes à busca ativa. O aumento da incidência é observado entre os meses de julho a outubro.

A Figura 25 mostra o coeficiente de incidência anual da DOED de 2002 à 2007.

Foi considerada a população de 25.000 habitantes.

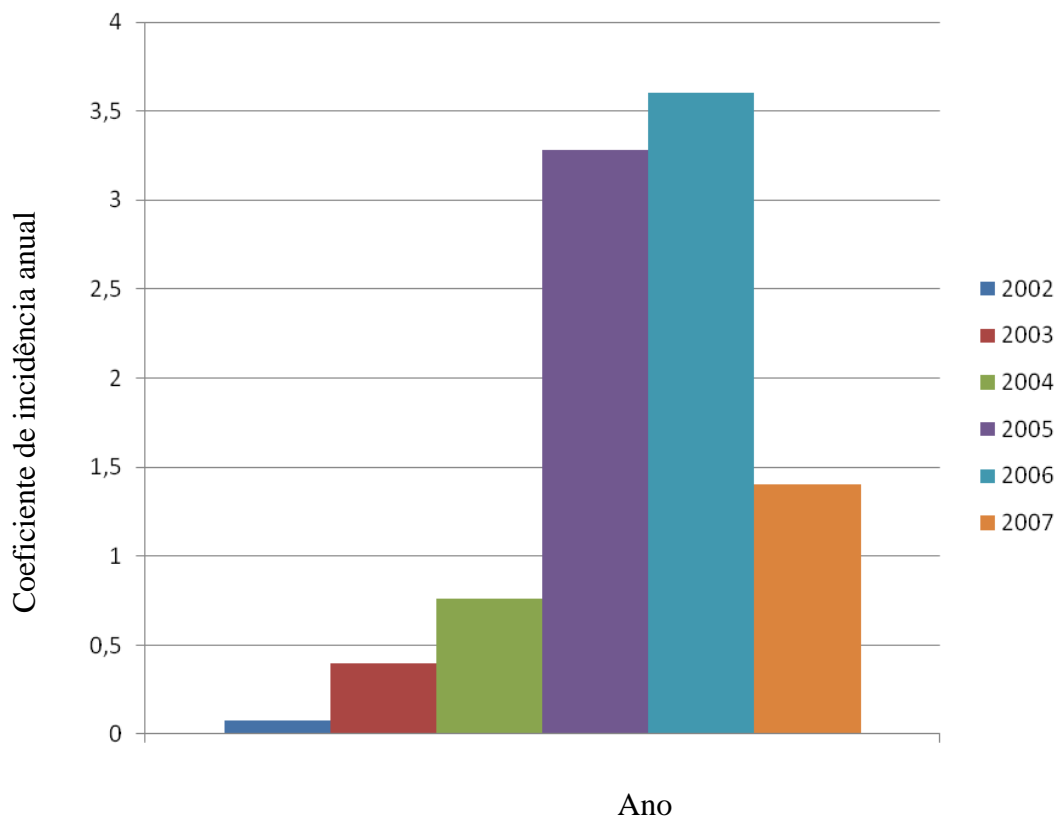


Figura 25: Coeficiente de incidência anual da DOED entre os anos de 2002 e 2007 no município de Araguatins/TO.

As figuras 26 e 27 mostram o coeficiente de incidência da DOED de janeiro a dezembro nos anos de 2006 (1ª figura) e 2007 (2ª figura). Foi considerada a população de 25.000 habitantes. A incidência foi maior no início do segundo semestre, diminuindo nos últimos meses de cada ano.

2006	numero de casos	INCIDÊNCIA
janeiro	11	0,44
fev	1	0,04
mar	2	0,08
abr	0	0
mai	1	0,04
jun	4	0,16
jul	17	0,68
agos	19	0,76
set	10	0,4
out	14	0,56
nov	8	0,32
dez	3	0,12

Figura 26 - Cálculo da incidência da DOED mês a mês no ano de 2006. A coluna "a" apresenta os meses do ano, a coluna "b" os casos confirmados de DOED em cada mês, a coluna "c" é a incidência da doença por 1000 habitantes. Os meses de maior incidência são julho e agosto, meses que correspondem à seca do rio e às férias escolares. A partir de setembro observa-se uma diminuição gradativa no coeficiente de incidência.

2007	numero de casos	INCIDÊNCIA
janeiro	3	0,12
fev	1	0,04
mar	1	0,04
abr	0	0
mai	2	0,08
jun	2	0,08
jul	14	0,56
agos	6	0,24
set	6	0,24
out	0	0
nov	0	0
dez	0	0

Figura 27 - Cálculo da incidência da DOED mês a mês no ano de 2007. A coluna "a" apresenta os meses do ano, a coluna "b" os casos confirmados de DOED em cada mês, a coluna "c" é a incidência da doença por 1000 habitantes. Diferente de 2006, o aumento no número de casos é observado principalmente no mês de julho, enquanto que nos meses seguintes a notificação diminuiu. Nos 3 últimos meses não foi notificado nenhum caso de DOED.

Para o cálculo da variável “Faixa Etária”, dividiram-se os pacientes em faixas etárias (figura 28) obtendo-se o seguinte resultado: 28% dos pacientes tinham entre 10 e 14 anos, seguidos por pacientes que tinham entre 05 e 09 anos, que representam 27% dos casos, o que totalizava 55% dos casos registrados. Os pacientes que tinham idade entre 15 e 19 anos representaram 12%, enquanto os que tinham entre 20 e 29 anos representaram 16%. Os pacientes com menos de 4 anos e os com mais de 30 anos juntos representaram 17% dos casos registrados.

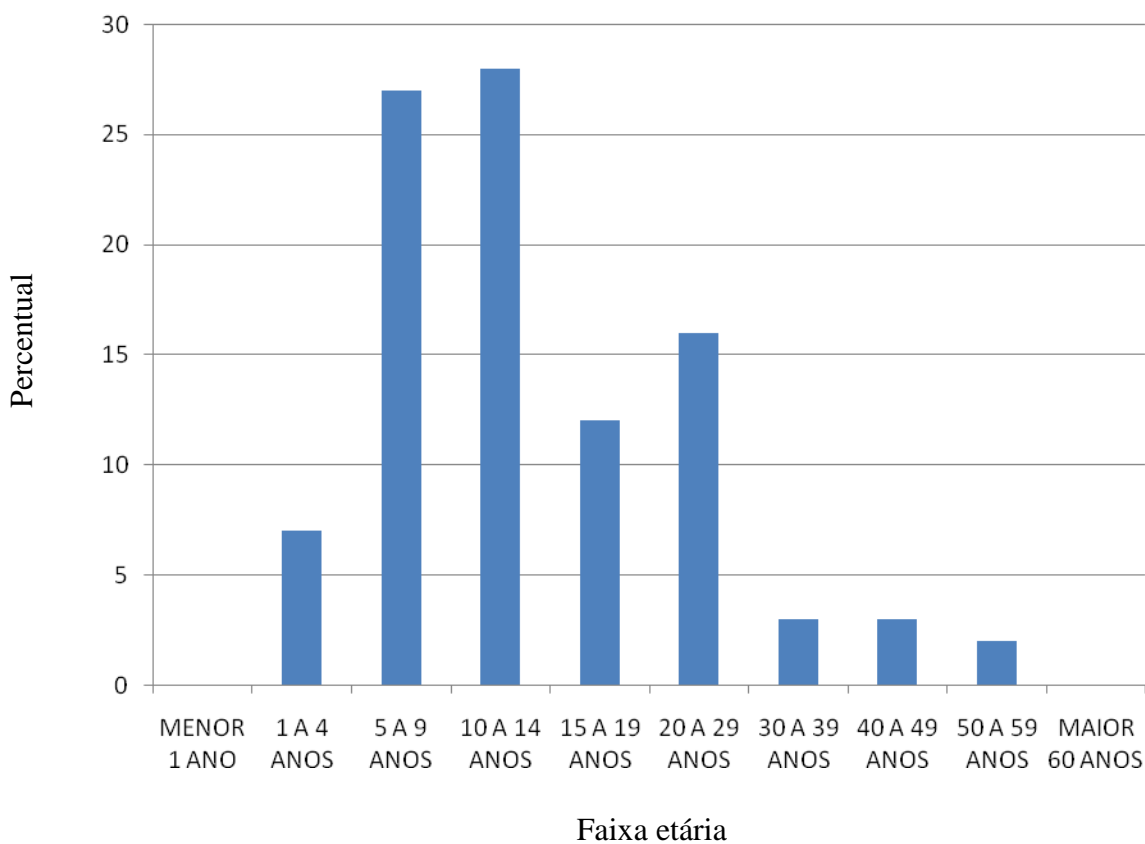


Figura 28: Percentual de pacientes com DOED por faixa etária nos anos de 2006 e 2007

Neste estudo a maioria dos indivíduos pertenceu ao sexo masculino, com 70% dos casos, nos anos de 2006 e 2007 (Figura 29).

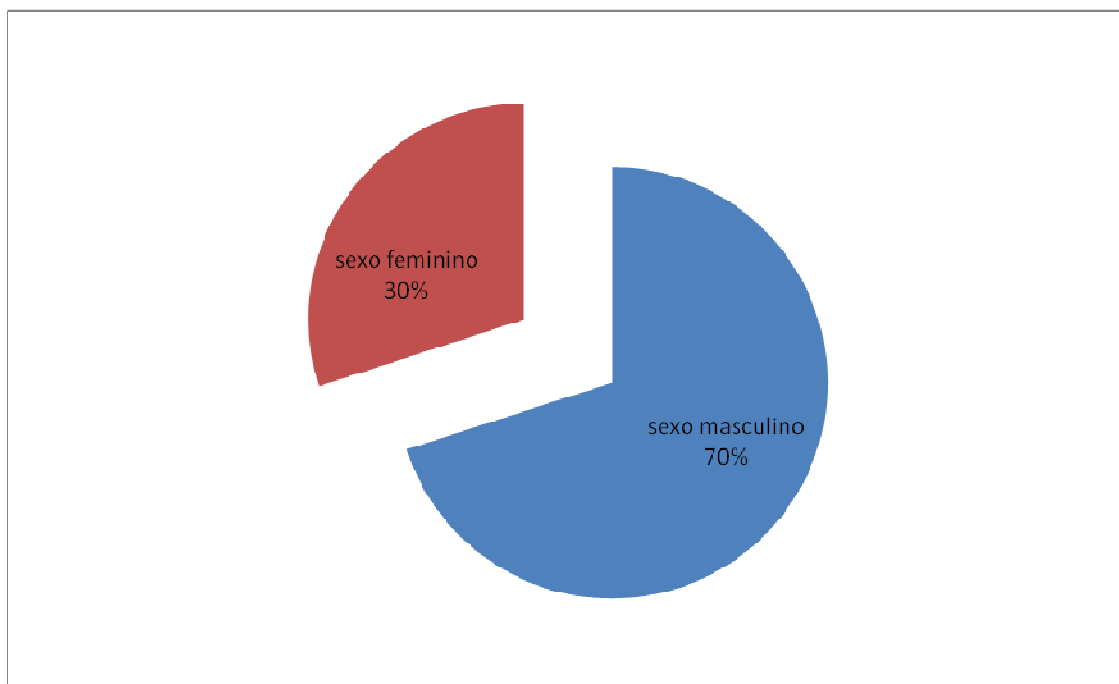


Figura 29: Percentual de casos de acordo com o sexo dos pacientes no período de janeiro/2006 a dezembro/2007

5 Discussão

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)⁸, em 2020, existirão no mundo 75 milhões de pessoas cegas - hoje são 45 milhões - e mais de 225 milhões portadoras de baixa visão, sendo que 90% desse montante estaria em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos e que os custos diretos e indiretos da deficiência visual para as sociedades atingidas somariam vários bilhões de dólares em prejuízos, investimentos não realizados e recursos desperdiçados. Por fim, o dado mais importante, que entre 60% e 75% desses casos de cegueira e baixa visão seriam evitáveis e/ou curáveis.

De acordo com o Conselho Brasileiro de Oftalmologia⁹, o Brasil detém hoje cerca de 2,83% da população mundial. Cálculos apontam para a existência de um milhão e cem mil cegos no Brasil (0,6% da população estimada) e cerca de 4 milhões de deficientes visuais sérios.

Estudos populacionais indicam baixa prevalência da cegueira infantil, de 0,2 a 0,3 por 1000 crianças em países desenvolvidos e de 1,0 a 1,5 por 1000 crianças em países em desenvolvimento. Já a prevalência de baixa visão é estimada como sendo três vezes maior, segundo o Banco de Dados Mundiais sobre a Cegueira da OMS. Em 1996, a OMS adotou o conceito de anos de cegueira que resulta da multiplicação do número de cegos (ou portadores de baixa visão) pelo número de anos que a pessoa vive cega (ou com baixa visão). Esse conceito foi adotado para comparar a prevalência de diferentes problemas relacionados à deficiência visual. Assim, sendo a prevalência da cegueira e baixa visão infantil similar a da catarata senil, aquela também deve ser prioridade em

⁸ http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/outubro/oms_cegueira_poderia_evitada_0910.pdf

⁹ http://www.cbo.com.br/site/noticia.php?id_noticia=42

Saúde Pública em oftalmologia na América Latina. (Bissh apud Brito & Veitzman, 2000).

De acordo com dados da SESAU/TO o município de Araguatins apresentava, em dezembro de 2007, 312 casos registrados de doença ocular de etiologia desconhecida. Isso representa 0,9% da população atual do município. No entanto, segundo a diretora de Vigilância Epidemiológica da SESAU/TO, Perciliana Joaquina Bezerra de Carvalho, esses dados podem estar incorretos, visto que a SESAU/TO não tem recebido, desde janeiro de 2008, informações de novos casos por parte da secretária de saúde de Araguatins (comunicação pessoal). A diretora relata contudo que foi implantado no município o “Sistema de Vigilância da Doença ocular de Etiologia Desconhecida” em janeiro de 2006, com a finalidade de detectar oportunamente casos e/ou surtos de doença ocular de etiologia desconhecida (Boletim Eletrônico do Ministério da Saúde Ano 06 – Nº 06).

Tendo os sintomas dos pacientes-caso iniciado em julho de 2002 e o aumento do número de casos coincidindo com o período de seca dos rios (julho a setembro), época em que as crianças estão de férias e há uma maior utilização das praias pelos veranistas, é de se esperar que novos casos estivessem sendo relatados.

Os dados de Araguatins mostram que a maioria dos pacientes portadores de DOED são crianças, sendo que em 2006, de um total de 90 casos novos, o número de crianças afetadas com idade inferior a 10 anos foi de 36 casos. Em 2007, dos 35 novos casos 7 eram crianças menores de 10 anos. Essa maior incidência pode ser associada ao fato de que crianças estão particularmente em risco de sofrer lesão ocular devido à sua capacidade reduzida para detectar e evitar possíveis perigos (OLURIN, 1971; ALHASKI & ALMAAITA 2007)

A presença de opacidade corneana, uni ou bilateral, observada no presente estudo é uma situação que compromete a visão do paciente, principalmente se a opacidade ocorrer em uma idade na qual o paciente ainda esteja com o sistema visual em formação. A redução da perda visual nas crianças envolve problemas específicos que são diferentes dos desafios de controle da cegueira em adultos.

As crianças nascem com um sistema visual imaturo e, para o desenvolvimento visual normal ocorrer, elas necessitam que imagens nítidas sejam transmitidas para o córtex visual. Falha no amadurecimento visual (ambliopia) não pode ser corrigida na vida adulta, levando-se assim um nível de urgência o tratamento de doença ocular na infância que não se aplica necessariamente às condições dos adultos. A avaliação da visão e exame dos olhos também apresenta dificuldades específicas, que exigem tempo e experiência por parte do examinador. Além disso, os olhos das crianças não podem ser considerados como versões menores dos olhos de adultos, porque eles respondem de forma diferente ao tratamento médico e cirúrgico. (GILBERT & FOSTER, 2001). Embora o número de casos com complicações graves ainda seja pequeno no município, convêm lembrar que a opacidade corneana se encontra entre as situações de prioridade para a OMS, por reduzir a capacidade de trabalho dos pacientes acometidos. A DOED que afeta a população de Araguatins, embora ainda não devidamente reconhecida como uma doença com nomenclatura oficial, se encontra no grande e variado grupo de doenças oculares infecciosas e inflamatórias que causam cicatrizes na córnea. A opacidade corneana é considerada como a quarta causa de cegueira no mundo (5,1%), sendo uma das principais causas de deficiência visual depois da catarata, glaucoma e degeneração macular segundo dados da OMS em 2002.^{10,11}

¹⁰ <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index9.html>

¹¹ <http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue3/79%283%29214-221.pdf>

De acordo com o coeficiente de incidência calculado para os anos de 2002 até 2007 a diminuição de novos casos pode estar associada ao trabalho desenvolvido pelas esferas competentes em âmbito municipal, estadual e federal. A manutenção desses baixos níveis de incidência, no entanto, é duvidosa devido ao não envio de dados referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010 por parte da secretaria de saúde municipal de Araguatins para a Vigilância Epidemiológica do Estado do Tocantins. A falha no correto acompanhamento da DOED pode prejudicar em longo prazo o controle adequado dessa doença, levando-se em conta que as infecções oculares são evitáveis, mas são uma causa desafiadora de cegueira, principalmente em crianças, dado o número de anos-cego envolvidos. (ONAKPOYA & ADEOYE, 2009). Além disso, os dados disponíveis sugerem que, em todo o mundo, a cicatrização da córnea é a causa mais importante de cegueira evitável, seguida de catarata e retinopatia da prematuridade. O controle dessas condições é uma prioridade no programa VISÃO 2020, juntamente com a correção dos erros refrativos significativos e prestação de serviços de baixa visão. (GILBERT & FOSTER, 2001)

Segundo a Secretária de Estado de Saúde¹² a perda da visão acarreta graves prejuízos às atividades escolares, intelectuais, profissionais e sociais, restringindo fortemente a produção e a capacidade de trabalho das pessoas afetadas. A descoberta precoce dos problemas e posterior encaminhamento do indivíduo aos serviços especializados são fundamentais, haja vista que dois em cada três casos de cegueira poderiam ser evitados caso houvesse tal procedimento.

O reconhecimento precoce dos sinais e sintomas de problemas oculares e visuais, bem como a verificação periódica da acuidade visual e a prática dos cuidados de prevenção de infecções e de doenças oculares são medidas importantes para se

¹² http://www.saude.df.gov.br/003/00301009.asp?ttCD_CHAVE=49233

manter uma boa capacidade visual. A educação em saúde ocular, através da disseminação de informações gerais e de práticas preventivas, é um caminho seguro que conduz a uma atividade visual saudável e, se for o caso, à detecção precoce de problemas oculares e ao encaminhamento dos indivíduos afetados aos serviços de saúde. Tendo em conta as dificuldades no tratamento da cegueira corneana uma vez consumada, os programas de prevenção de saúde pública constituem a opção mais eficaz em relação ao custo para reduzir a carga global de cegueira corneana.¹³

Os dados referentes a maior incidência de casos nos meses compreendidos entre julho e outubro, observada na época de seca do rio, reforça a ideia inicial de que o aumento da concentração das espículas nas águas do rio nessa época do ano (VOLKMER-RIBEIRO & BATISTA, 2006) está diretamente relacionada.

Contudo, para que se possam tomar medidas preventivas e ou tratamento adequado, é de suma importância identificar o agente causal e o modo pelo qual a patologia se desenvolve. Nossos dados de clínica apontam para a presença de espículas na região ocular, sugerindo que, a princípio, a lesão ocorre por stress mecânico (VOLKMER-RIBEIRO *et al*, 2006).

No entanto, o material utilizado nos ensaios de citotoxicidade foi submetido a filtração em membrana de 0,45 μm , o que muito provavelmente removeria qualquer vestígio de espículas, sugerindo assim a presença de um componente citotóxico solúvel.

O teste de citotoxicidade para biomateriais seguiu as diretrizes da ISO 10.993-5, e foi desenvolvido com o método que se baseia no procedimento originalmente desenvolvido por BOREFREUND E PUERNER (1984), sobre uma camada de células, para fazer a triagem de agentes citotóxicos em geral.

¹³ <http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue3/79%283%29214-221.pdf>

A viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade de um material. As membranas celulares podem ser danificadas por muitas substâncias, resultando na diminuição da captura de um corante vital. Assim, a quantificação das células vivas, danificadas ou mortas pode ser efetuada pela intensidade de cor da cultura celular em um espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

No presente trabalho, o teste de citotoxicidade *in vitro* foi baseado na avaliação quantitativa de células viáveis depois de expostas ao extrato do biomaterial. A toxicidade induzida pela amostra sob teste é medida em uma faixa de concentrações de extrato do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS é tomada como o parâmetro de toxicidade (CORY *et al.*, 1991).

Nos ensaios de viabilidade celular realizados, observou-se atividade citotóxica nos extratos brutos das espécies *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella*.

As duas espécies são encontradas nas águas do rio Araguaia, na região que margeia a cidade. A presença de espículas da espécie *Drulia uruguayensis* foi confirmada em análise histopatológica de material proveniente de cirurgias de lensectomia e vitrectomia posterior (VOLKMER-RIBEIRO *et al.*, 2006). A espécie *Oncosclera navicella* foi utilizada para avaliarmos se os resultados encontrados seriam semelhantes.

Não existem até a presente data, na literatura consultada, ensaios de viabilidade celular para as espécies de esponjas de água doce utilizadas neste trabalho. No entanto, extratos brutos de esponjas marinhas da costa brasileira têm demonstrado potencialidade citotóxica e neurotóxica. (RANGEL *et al.*, 2001.)

Neste estudo, além do extrato bruto ser avaliado com ensaio de citotoxicidade, os extratos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as

amostras correspondentes a cada pico observado foram submetidas à medida de absorvância em espectrofotômetro, o que permitiu estimar a concentração protéica.

No caso dos ensaios de viabilidade celular das amostras de extrato da *Drulia uruguayensis*, purificadas na CLAE, cada pico mostrou atividade citotóxica isoladamente com o IC₅₀ em diferentes concentrações. Observou-se também que cada amostra analisada apresentou um aumento na citotoxicidade nas diluições finais feitas durante os ensaios. Assim, os dados sugerem que além da lesão mecânica causada pelas espículas, existem componentes solúveis, com atividade citotóxica que provavelmente atuam de forma sinérgica com o agente mecânico, levando ao agravamento da lesão ocular.

Os dados ficam mais interessantes quando se passa a considerar a citotoxicidade após a irradiação. A irradiação com raios gama (25 kGy) ou ultravioleta não levou a uma atenuação significativa da citotoxicidade, como seria de esperar caso o agente tóxico fosse de natureza protéica ou peptídica, já que essa dose de irradiação é suficiente para desnaturar as proteínas presentes no biomaterial.

Nossos estudos apontam que além das espículas, que causaram lesão mecânica nos olhos dos indivíduos avaliados, as esponjas apresentam ainda um componente não protéico que causa citotoxicidade e que pode *per se* justificar as lesões oculares observadas.

Do ponto de vista epidemiológico, a ausência de comunicação de novos casos para o Serviço de Vigilância Epidemiológica da SESAU/TO sugere uma falha de comunicação da equipe do Sistema de Vigilância da Doença Ocular de Etiologia Desconhecida, instalado no município de Araguatins/TO em janeiro 2006, prejudicando a implantação, em tempo hábil, de medidas preventivas e curativas junto aos pacientes acometidos pelo agravo ocular.

6. CONCLUSÕES

Os extratos das esponjas *Drulia uruguayensis* e *Oncosclera navicella navicella* apresentaram toxicidade quando em contato com células.

A lesão tecidual provocada nos pacientes que entraram em contato com as esponjas tem, além do agravo mecânico (penetração da espícula no tecido ocular), um componente químico solúvel de natureza desconhecida.

A dose esterilizante de 25 kGy não alterou a ação citotóxica das esponjas, permitindo concluir que o agente citotóxico não é de origem protéica, uma vez que nessa dose a atividade protéica seria inativada.

O ensaio de citotoxicidade celular dos extratos brutos e dos extratos purificados de mostrou que a atividade citotóxica da esponja *Oncosclera navicella* foi mais acentuada que a da espécie *Drulia uruguayensis*.

O perfil epidemiológico da Doença Ocular de Etiologia Desconhecida no município de Araguatins/TO, no período estudado mostra que os indivíduos mais freqüentemente acometidos eram do sexo masculino com idade entre 5 e 14 anos.

A DOED tem sua maior incidência entre os meses de julho e outubro, coincidindo com a seca dos rios da região.

7 - Referências Bibliográficas

ALHASKI M, ALMAAITA J. Retrospective analysis of pediatric ocular trauma at Prince Ali Hospital. *Middle East Journal of Family Medicine*. 2007; 5:42-5.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/outubro/oms_cegueira_poderia_evitada_0910.pdf

. Acesso em: 27 abr. 2010.

BIOTA - www.biota.org.br/pdf/v4cap01.pdf. Acesso em: 11 jul. 2008.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO ANO 06 - No 06 - SVS - 7 disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivospdf/boletim_eletronico_06_06_novo.pdf. Acesso em: 29 abr. 2010.

BOREFREUND, E., PUENER, J.A. (1984), "A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)", *J. Tissue Cult. Meth.*, 9 (1), 7-9.

BRAZIL, T.P.S. 1938. **Cauicy**. Relatório apresentado ao Ministério das Relações Exteriores em 1936 pelo chefe da Comissão Demarcadora de limites do serviço de Oeste, p. 11-23.

BRITO, P. R., VEITZMAN, S. Causas de cegueira e baixa visão em crianças. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v. 63, n. 1, fev. 2000 .

CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA. Disponível em

http://www.cbo.com.br/site/noticia.php?id_noticia=42 . Acesso em: 22 abr. 2010.

CORY, A.H. (1991) Use of na aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.*, 3, 207-212.

GILBERT, C., FOSTER, A. Childhood blindness in the context of VISION 2020: the right to sight. *Bull World Health Organ*, Genebra, v. 79, n. 3, 2001.

HADDAD JUNIOR, Vidal. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 36, n. 5, Oct. 2003.

HILBERT, P.P. 1955 **A ceramic arqueológica de Oriximiná**. Belém, Instituto de Antropologia e Etnologia do Pará. Museu Goeldi, vol 9, p. 33-337.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2009/POP2009_DOU.pdf

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=170220#>

ISBISTER, G.K. & HOOPER, J.N.A. - Clinical effects of stings by sponges of the genus *Tedania* and a review of sponge stings worldwide. *Toxicon*; 46(7): 782-5, 2005

LAEMMLI U.K. (August 1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227 (5259): 680–685

MACHADO, O.X.B. 1947. Zoologia: Espongiários (Porífera). **Imprensa Oficial**. Rio de Janeiro, Publicação 102, Anexo 5, 4p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunolog Meth* 65, 55-63.

OLURIN O. Eye injuries in Nigeria. A review of 433 cases. *Am J Ophthalmol* 1971;72: 159-66.

ONAKPOYA, O. H., ADEOYE, A. O. Childhood eye diseases in southwestern Nigeria: a tertiary hospital study. *Clinics*, São Paulo, v. 64, n. 10, 2009.

O GLOBO <http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mat/2009/12/19/cegueira-na-floresta-doenca-misteriosa-assombra-ribeirinhos-do-araguaia-915292497.asp>, acessado em 28/04/2010

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/outubro/oms_cegueira_poderia_evitada_0910.pdf

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - Disponível em:
<http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index9.html>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue3/79%283%29214-221.pdf>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue3/79%283%29214-221.pdf>

PORÍFERA BRASIL. Disponível em:
<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/2-pesquisa/pinheiros-08/pinheiros-08-p6.htm>

PORTAL DA SAÚDE. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_araguatins_1801.pdf

RANGEL, M., SANCTIS, B., FREITAS, J.C., POLATTO, J.M., GRANATO, A.C., BERLINK, R.G.S., HADJU, E. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porífera) from southeastern Brazilian coast. *J Esp Mar Biol Ecol* 262, 31-40, 2001.

Secretária de Estado de Saúde - Disponível em:
http://www.saude.df.gov.br/003/00301009.asp?ttCD_CHAVE=49233

Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde - Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivospdf/boletim_eletronico_06_06_novo.pdf

Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde - Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_araguatins_1801.pdf

SIMPSON, T.L. 1984 *The cell biology of sponges*. New York, Springer-Verlag, 662p.

THOMAS, C & S. SCOTT. 1997. *All stings considered: first aid and medical treatment of Hawai's marine injuries*. Hawai, University of Hawai Press, 231p.

VOLKMER-RIBEIRO, C& BATISTA, T. C. A. *Investigação do agente causal de casos de doença ocular de etiologia desconhecida, ocorridos na cidade de Araguatins-TO. I relatório técnico SESAU/TO.*

VOLKMER-RIBEIRO, C& BATISTA, T. C. A. *Parecer preliminar sobre os casos de doença ocular de etiologia desconhecida, particularmente na população infantil de Araguatins/TO, 2006 a*

VOLKMER-RIBEIRO, C., LENZI H. L., ORÉFICE F., PELAJO-MACHADO M., ALENCAR L. M., FONSECA C. F.. Freshwater sponge spicules: a new agent of ocular pathology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol 101 (8): 899-903, December 2006

VOLKMER-RIBEIRO, C., BATISTA, T.C.A.. Levantamento de cauxi (Porifera, Demospongiae), provável agente etiológico de doença ocular em humanos, Araguatins, rio Araguaia, Estado do Tocantins, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 24, n. 1, Mar. 2007.