

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parceira
Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida por Cecília Maria Resende Gonçalves
de Carvalho e aprovada pela Comissão Julgadora
em 15.12.93

[Assinatura]

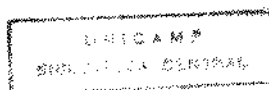
**PREVALÊNCIA DE HIPOVITAMINOSE A EM CRIANÇAS DE FAVELAS
DE CAMPINAS, SP. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA DE IMPRESSÃO
DA CONJUNTIVA OCULAR COM OS NÍVEIS DE RETINOL SÉRICOS
DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA.**

Cecília Maria Resende Gonçalves de Carvalho (m) 953
Nutricionista

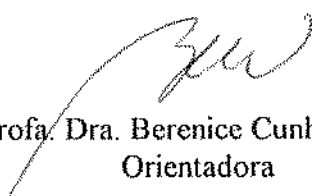
Orientadora: Dra. Berenice Cunha Wilke (m) 953
Co-orientador: Dr. Jaime Amaya-Farfan (m)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência da Nutrição.

Campinas, SP - 1993



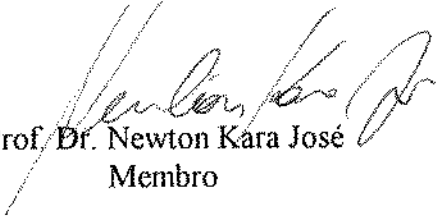
Banca examinadora



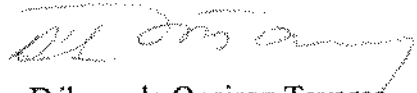
Profa. Dra. Berenice Cunha Wilke
Orientadora



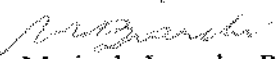
Profa. Dra. Maria José Roncada
Membro



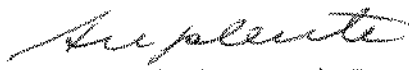
Prof. Dr. Newton Kara José
Membro



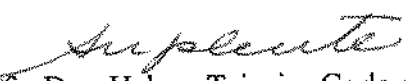
Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares
Membro



Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi
Membro



Prof. Dr. Antônio de Azevedo Barros Filho
Membro



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Membro

Campinas, 15 de *dezembro* de 1993

Ao meu esposo,
Marcos,
e a nossa querida
BIA

Aos meus pais,
irmãos e sobrinhos,

-dedico-

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Piauí pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

Ao Programa de Incentivo à Capacitação de Docentes (PICD/MEC), pela bolsa de estudo concedida no decorrer do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Apoio de Ensino à Pesquisa (FAEP/UNICAMP) pelo apoio financeiro necessário para a realização da pesquisa.

Aos Coordenadores dos Centros de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde, Campinas/SP, pela colaboração e apoio concedido na realização da coleta de sangue.

À Dra. Alzira M. Nicolini Delgado (Deptº Oftamologia/UNICAMP) pela realização dos exames oftalmológicos.

Aos professores e funcionários do laboratório de bioquímica do Deptº de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP, pela contribuição e realização das análises bioquímicas (hemograma, albumina e proteínas totais).

Ao Professor Ademir Pantanete (Deptº Matemática e Estatística/UNICAMP) pela colaboração e orientação estatística na fase inicial do projeto.

Ao Professor Ronald Vencovsky (Deptº Genética/ESALQ/USP) pela orientação e sugestões estatísticas, assim como ao Sérgio Arnold V. Schinider pela ajuda nos cálculos e interpretação das análises.

Às Professoras Ana M. Segal Corrêa e Mariliza Berti de A. Barros pelas facilidades concedidas junto ao Laboratório de Computação do Depº de Medicina Preventiva/FCM/UNICAMP, assim como ao colega Eduardo Luiz Hoehne pelo auxílio no manuseio do Prograna Epi Info.

Ao Professor Antônio de Azevedo Barros Filho pelas sugestões concedidas na avaliação antropométrica.

À Professora Helena Teixeira Godoy (Deptº de Ciência de Alimentos/FEA/UNICAMP) pelas sugestões nas análises cromatográficas.

À todos os Professores do Deptº de Planejamento Alimentar e Nutrição/FEA/UNICAMP pela colaboração e ensinamentos efetivamente prestados, em especial ao Professor Jaime Amaya Farfan pelas sugestões, orientação e compreensão e, a Prof. Debora de Queiroz Tavares pelo estímulo e amizade.

À Dra. Berenice Cunha Wilke pelas sugestões e oportunidade para a realização desta pesquisa.

À Yara Fagnani Honório pela constante colaboração e, pelos serviços prestados nos trabalhos de fotografias.

À Bibliotecária Creusa Kasume Nomura pela revisão das referências bibliográficas.

À todos os colegas do curso de Pós-Graduação pela convivência e amizade, em especial à Solange Bezerra Furtado e Suzana Rabelo pelo apoio constante e amigo.

Aos colegas Claudemiro da Silva e Isabel de Fátima Valentino pela ajuda no manuseio do programa Word for Windows.

À todos aqueles que auxiliaram nas tarefas do trabalho de campo, em especial à Célia Cortez e a enfermeira Neuza.

Ao meu esposo Marcos pelo apoio intenso, compreensivo e tolerante.

Aos pesquisadores do Dana Center for Preventive Ophthalmology, Baltimore, USA, pela doação do papel filtro (Millipore HAWP 304 Fo) para a realização da citologia de impressão ocular e, ao Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição pela doação das cápsulas de acetato de retinila.

Aos pais e as crianças que aceitaram participar da pesquisa sem os quais não seria possível a realização do trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Vitamina A: generalidades e funções.....	5
3.2. Indicadores do estado nutricional de vitamina A.....	9
3.2.1. Indicadores clínicos.....	10
3.2.2. Indicadores funcionais.....	11
3.2.3. Indicadores alimentares.....	12
3.2.4. Indicadores bioquímicos.....	13
3.2.4.1. Concentração de retinol no fígado.....	13
3.2.4.2. Níveis sanguíneos de retinol.....	14
3.2.4.3. Métodos da resposta relativa a uma certa dose de retinol (RDR).....	16
3.2.4.4. Método de diluição isotópica.....	17
3.2.5. Indicadores citológicos.....	17
3.2.5.1. Índice de ceratinização (IC).....	17
3.2.5.2. Citologia de Impressão da Conjuntiva Ocular (CICO).....	18
3.3 Prevalência de hipovitaminose A e Xerofalmia.....	23
3.4. Prevalência de hipovitaminose A e Xerofalmia no Brasil.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Amostra.....	31
4.1.1. Local e época da pesquisa.....	31
4.1.2. Casuística.....	31
4.1.3. Critérios de seleção.....	31
4.1.4. Cálculo da amostra.....	32

4.1.5. Processo de amostragem.....	32
4.1.6. Coleta de dados.....	37
4.1.7. Característica da amostra.....	37
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Antropometria.....	38
4.2.2. Exame oftalmológico.....	38
4.2.3. Inquérito alimentar.....	39
4.2.4. Citologia de impressão da conjuntiva ocular (CICO).....	40
4.2.5. Avaliação bioquímica.....	43
a) Coleta de sangue.....	43
b) Armazenamento das amostras.....	44
c) Preparo e quantificação dos padrões.....	44
4.2.5.1. Determinação do retinol no soro.....	45
1) Cromatografia líquida de alta eficiência.....	45
a) Reagentes.....	45
b) Sistema cromatográfico.....	45
c) Curva padrão de retinol.....	46
d) Extração do retinol no soro.....	46
e) Identificação do pico de retinol.....	47
f) Testes de recuperação.....	47
g) Precisão e reprodutibilidade.....	48
4.2.5.2. Exame hematológico.....	48
4.2.5.3. Proteínas totais e albumina.....	48
4.2.6. Suplementação terapêutica.....	49
4.2.7. Processamento e análise estatística dos dados.....	49
4.2.7.1. Análise estatística.....	49
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 51
5.1. Aspectos amostras.....	51
5.2. Características da amostras.....	51
5.2.1. Sexo e idade.....	51
5.2.2. Renda per capita.....	52
5.2.3. Instrução dos pais.....	54
5.2.4. Tamanho da família.....	55
5.2.5. Tipo de habitação.....	55
5.2.6. Avaliação antropométrica.....	55
5.2.7. Inquérito dietético.....	59
5.2.8. Parâmetros hematológicos e protéicos.....	61
5.3. Padronização do método cromatográfico.....	63
5.3.1. Identificação do pico de retinol.....	64
5.3.2. Construção das curvas.....	66
5.3.3. Precisão e reprodutibilidade.....	71
5.3.4. Dificuldades e adaptações realizadas.....	71
5.4. Avaliação nutricional do estado de vitamina A.....	72

5.4.1. Frequência de consumo alimentar.....	72
5.4.2. Exame oftalmológico.....	78
5.4.3. Avaliação citológica (CICO).....	78
5.4.3.1. Aceitabilidade pela criança.....	78
5.4.3.2. Prevalência de hipovitaminose A pela CICO.....	80
5.4.4.3. Leitura direta no papel de celulose (PC) x leitura na lâmina (LL).....	83
5.4.4. Prevalência de hipovitaminose A pelas dosagens de retinol no soro.....	85
5.5. Comparação da CICO com as dosagens de retinol no soro por CLAE.....	93
5.6. Suplementação.....	105
5.7. Vantagens e desvantagens da CICO.....	111
 6. CONCLUSÕES.....	 113
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 115
 ANEXOS.....	 138

LISTA DE TABELAS

Página

1. Distribuição das favelas por Área Regional, grupos e número de favelas sorteadas. Campinas, SP, 1991/1992.....	33
2. Discriminação das favelas sorteadas por grupo, ordem e período de participação na pesquisa. Campinas, SP, 1991/1992.....	34
3. Distribuição por favelas do número de crianças e de famílias selecionadas para o estudo. Campinas, SP, 1991/1992.....	36
4. Distribuição das crianças, por faixa de idade e sexo. Campinas SP, 1991/1992.....	52
5. Distribuição das crianças segundo a renda familiar per capita. Campinas, SP, 1991/1992.....	53
6. Grau de instrução do pai e da mãe das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.....	54
7. Distribuição (%) das crianças estudadas referentes aos indicadores altura/idade e peso/altura, em relação a distribuição referência NCHS. Campinas, SP, 1991/1992.....	57
8. Média e desvio padrão do consumo diário de energia, proteínas, ferro e vitamina A entre crianças de 3 a 10 anos. Campinas, SP, 1991/1992.....	59
9. Porcentagem de adequação de consumo de energia, proteínas, vitamina A e ferro das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.....	61
10. Distribuição dos valores de hemoglobina segundo a idade das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.....	63
11. Resultados da análise de regressão linear para as curvas construídas em solvente e "pool" de soro com e sem vitamina A.....	67
12. Comparação dos modelos de regressão linear obtidos para cada curva..	68
13. Recuperação do retinol (%) adicionado ao "pool" de soro sem vitamina A.....	70
14. Porcentagem de distribuição das crianças por categorias de risco de deficiência de vitamina A, segundo o IVACG (1989). Campinas, SP, 1991/1992.....	72
15. Frequência de consumo dos alimentos mais consumidos pelas crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	74
16. Aceitabilidade ao exame da CICO, segundo a idade das crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	79

17. Prevalência de hipovitaminose A pela CICO em 298 crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	81
18. CICO: Comparação da leitura direta no papel de celulose com a leitura feita na lâmina.....	83
19. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos níveis de retinol no soro segundo a idade das crianças. Campinas, SP, 1991/ 1992.....	87
20. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos níveis de retinol no soro segundo o sexo das crianças. Campinas, SP, 1991/ 1992.....	88
21. Prevalência de hipovitaminose A em crianças de 3 a 10 anos, pelo método de dosagem de retinol no soro, segundo a idade. Campinas, SP, 1991/1992.....	89
22. Prevalência de hipovitaminose A em crianças de 3 a 10 anos pelo método de dosagem de retinol no soro, segundo o sexo. Campinas, SP, 1991/1992.....	90
23. Distribuição de células caliciformes e alterações do epitélio da conjuntiva ocular.....	98
24. Distribuição das crianças segundo os resultados da CICO e níveis de retinol no soro, utilizando-se o ponto de corte de cinco células caliciformes.....	100
00	
25. Comparação dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) em função dos resultados da CICO.....	101
26. Variação da média e mediana dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) de 113 crianças em função de vários pontos de corte da CICO.....	102
27. Variação das médias dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) de 113 crianças, em função das diversas classes da CICO.....	103
28. Sensibilidade e especificidade segundo diversos pontos de cortes da CICO comparados com os níveis de retinol no soro de 113 crianças.....	104
29. Sensibilidade e especificidade das diversas classes de CICO segundo os níveis de retinol no soro de 113 crianças.....	105
30. Correlação dos resultados da CICO com os níveis de retinol no soro de 113 crianças.....	106
31. Níveis médios de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) antes e após a suplementação (200.000 UI) de acetato de retinila.....	110

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Mapa de distribuição das favelas pesquisadas.....	35
2. Distribuição (%) do índice altura/idade de 341 crianças, de ambos os sexos, tendo como referência NCHS. Campinas, SP, 1991/1992.....	56
3. Distribuição (%) do índice peso/altura de 320 crianças, de ambos os sexos, tendo como referência o NCHS. Campinas, SP, 1991/1992.....	58
4. Cromatograma típico do retinol e do acetato de retinila.....	64
5. Co-cromatografia do retinol e do acetato de retinila em "pool" de soro antes (a) e após (b) a adição de padrão (retinol).....	65
6. Curva padrão de retinol em "pool" de soro normal.....	69
7. Frequência dos alimentos mais consumidos por 138 crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	75
8. Frequência dos alimentos mais consumidos por 138 crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	76
9. Distribuição (%) dos níveis de retinol no soro de 131 crianças. Campinas, SP, 1991/1992.....	86

LISTA DE ANEXOS

	Página
1. Frequências absolutas e relativas de células caliciformes observadas papel de celulose em ambos os olhos ou em um olho de crianças de favelas. campinas, SP, 1991/1992.....	138
2. Frequências absolutas e relativas dos níveis de retinol no soro de 113 crianças. campinas, SP, 1991/1992.....	139
3. Ficha 1. Avaliação nutricional das crianças.....	140
4. Ficha 2. Inquérito alimentar. Recordatório de 24 horas.....	143
5. Ficha 3. Lista de frequência dos alimentos mais consumidos pelas crianças.....	144
6. Ficha 4. Diagnóstico citológico.....	145

RESUMO

A prevalência de hipovitaminose A foi determinada por citologia de impressão da conjuntiva ocular (CICO) em 288 crianças com idade entre 3 e 10 anos, residentes em favelas do município de Campinas, SP, no período de abril de 1991 a fevereiro de 1992. O nível sérico de retinol foi também determinado em 131 crianças por cromatografia líquida de alta eficiência. A prevalência de hipovitaminose pela CICO foi 2,0%, enquanto os níveis de retinol sérico mostraram uma prevalência de 17,6%, com níveis entre 0,35 a 0,70 $\mu\text{mol/L}$. Crianças com CICO anormal apresentaram níveis séricos de retinol significativamente mais baixos ($0,65 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$) do que aquelas com CICO normal ($0,98 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$; $p=0,013$). Análise de regressão demonstrou correlação entre os dois métodos. Diferenças significativas foram encontradas usando-se as médias dos níveis de retinol sérico contra diferentes pontos de corte aplicados à CICO ($p<0,05$). A sensibilidade e especificidade variou com o critério de classificação da CICO, passando de 21,1 para 47,4%, e de 98,0 para 87,2%, respectivamente, mudando-se o ponto de corte da CICO de cinco para dez células caliciformes. Informações complementares sobre a caracterização da amostra foram obtidas para 341 crianças. A renda familiar per capita mostrou-se surpreendentemente alta, apesar de necessidades primárias como saneamento e moradia serem insatisfatórias. O consumo alimentar só foi adequado para proteínas (101,0 a 166,0%), sendo os menores valores de adequação aqueles encontrados para energia (82,0 a 94,0%) e, principalmente para vitamina A (53,0 a 78,0%) e ferro (37,0 a 49,0%). A presença de anemia foi 23,2%; muito poucas crianças tiveram hipoalbuminemia e nenhuma apresentou hipoproteinemia. Dados antropométricos foram avaliados pela distribuição do escore z, comparando-se com a população padrão-referência do National Center for Health Statistics. Para toda a amostra, os indicadores altura/idade e peso/altura identificaram que 33,2% e 15,3% das crianças, respectivamente encontravam-se abaixo de -1 desvio padrão.

SUMMARY

The prevalence of vitamin A deficiency was estimated by conjunctival impression cytology (CIC) in 288 children in the age group of 3 to 10 years, residing in slum areas of Campinas, SP, between april 1991 and february 1992. In 131 children, the level of serum retinol was also determined by high-performance liquid chromatography. The prevalence of vitamin A deficiency was 2.0%, by CIC and 17.6% by the method serum retinol with levels ranging from 0.35 to 0.70 $\mu\text{mol/L}$. Children with abnormal cytology had significantly lower serum retinol levels ($0.65 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$) than those with normal eyes ($0.98 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$; $p=0.013$). Results by two method were statistically correlated. There was significant difference between the mean serum retinol levels and the different classes of CIC, according to the cutting point ($p<0.05$). The sensitivity and specificity of the CIC varied with the classification criteria, the former increasing from 21.1 to 47.4% against a drop of the latter from 98.0 to 87.2% by changing the cutting-point from five to ten goblet cells. Complementary information about the sample was obtained for 341 children. The per-capita family income was surprisingly high, although primary needs such as sanitation and housing were unsatisfactory. The dietary intake of children was adequate only for protein (101.0-166.0%). Major inadequacies were found for iron (37.0-49.0%), vitamin A (53.0-78.0%) and energy (82.0-94.0%). Anemia was present in 23,2% of the children but very few had serum hipoalbuminemia and none hipoproteinemia. The anthropometric data were assessed by the z-score distribution of the height-for-age and weight-for-height criteria in relation to growth charts of the National Center for Health Statistics for a standard reference population. In the overall sample, 33.2% of the children were found below -1 z-score of height-for-age and 15.3% under -1 z-score of weight for height.

1. INTRODUÇÃO

A hipovitaminose A é um problema nutricional dos mais graves que acomete, principalmente, crianças pobres. Ainda hoje é considerada importante causa de cegueira em muitos países em desenvolvimento (WHO, 1982; ARAÚJO, 1989; BENDICH, 1989; SOMMER, 1989b).

Estima-se que cerca de 25 a 50 milhões de crianças no mundo, com ou sem sinais de xerofalmia, desenvolvem deficiência de vitamina A (BLOEM *et al.*, 1990a) e, a cada ano, entre 100.000 e 250.000 ficam cegas permanentemente (SOMMER, 1989a). Esta cegueira nutricional vem ocorrendo em proporções cada vez maiores e, hoje, já atinge, anualmente, cerca de 350.000 a 500.000 pré-escolares (THYLEFORS, 1990). Além das alterações oculares, retardo no crescimento (SOMMER, 1989b), aumento da susceptibilidade às infecções (SOMMER *et al.*, 1987), aumento do risco de doenças respiratórias (SOMMER *et al.*, 1984; SOLE *et al.*, 1987; SOMMER *et al.*, 1987; BLOEM *et al.*, 1990b) e diarreias (SOMMER, *et al.*, 1984; SOLE *et al.*, 1987; SOMMER *et al.*, 1987; BLOEM *et al.*, 1990b) são outras graves consequências de sua deficiência. Quando associada à desnutrição protéico-calórica, as formas avançadas da hipovitaminose A evoluem espontaneamente para o óbito.

Mesmo nas suas formas mais leves, a deficiência de vitamina A aparece como um fator importante na determinação da morbidade e da mortalidade na infância (SOMMER *et al.*, 1983). É necessário, portanto, que os casos marginais desta deficiência sejam diagnosticados tão cedo quanto possível, especialmente em populações de maior risco, para que medidas de prevenção e controle sejam implementadas.

A causa principal da hipovitaminose A é a deficiência alimentar de vitamina A. Sabemos que as fontes alimentares de vitamina A são numerosas; assim, é evidente que este problema poderia ser controlado se fossem priorizadas medidas preventivas no combate à hipovitaminose A. Entretanto, verifica-se que o aporte alimentar de vitamina A fornecido às crianças pobres continua baixo, sendo constantemente confirmado pelos baixos níveis sanguíneos de retinol (BATISTA, 1969; RONCADA *et al.*, 1978c; RONCADA, 1979; WILSON *et al.*, 1981; RONCADA *et al.*, 1984; CHAROENKIATKUL *et al.*, 1985; FAVARO *et al.*, 1986a).

As pesquisas no campo da hipovitaminose A são numerosas no mundo inteiro mas, apesar de suas graves consequências, no Brasil pouco se conhece sobre a profundidade e extensão deste problema. Muitos casos de deficiência subclínica com possibilidades de desenvolvimento de lesões oculares devem existir, visto que o consumo inadequado de vitamina A e carotenóides tem sido apontado como problema de Saúde Pública em várias regiões do Brasil (SILVA, 1959; ICNND, 1965; SHRIMPTON, 1984). No Estado de São Paulo, os inquéritos dietéticos, clínicos e bioquímicos revelam existir deficiência de vitamina A (RONCADA, 1972; RONCADA *et al.*, 1978b; RONCADA, *et al.*, 1978c; RONCADA, 1979; WILSON *et al.*, 1980; MAZILLI & GANDRA, 1981; RONCADA *et al.*, 1981; WILSON *et al.*, 1981; RONCADA *et al.*, 1984; WILSON & RONCADA, 1985; FAVARO *et al.*, 1986a).

No estudo da deficiência de vitamina A vários métodos já foram desenvolvidos, e, a maioria deles tem o propósito de reconhecer a carência subclínica, visando evitar o aparecimento das manifestações graves da deficiência. Os métodos já descritos têm apresentado limitações em estudos de campo. Alguns não são adequados, outros não são aceitos por falta de fidedignidade, e outros não são factíveis pela falta de cooperação das crianças. Assim, o método de diagnóstico continua a ser um fator limitante no reconhecimento e tratamento precoce da deficiência de vitamina A em populações, razão pela qual novas técnicas estão constantemente sendo testadas. O método tradicionalmente utilizado, dosagem dos níveis sanguíneos de retinol, é invasivo e não reflete o nível de armazenamento da vitamina A nos casos de deficiência moderada. Um teste mais simples para ser usado em levantamentos populacionais, que possa identificar os estágios iniciais da deficiência antes do desenvolvimento dos sinais clínicos seria, portanto, desejável.

Atualmente, para o diagnóstico precoce da deficiência de vitamina A, o teste citológico de impressão da conjuntiva ocular (CICO) é considerado um dos mais promissores, por ser simples, objetivo, atamático e de baixo custo, além de apresentar boa correlação com os níveis sanguíneos de retinol (AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1987; NATADISASTRA *et al.*, 1988; CARLIER *et al.*, 1989).

A CICO é uma técnica usada para coletar células da superfície da conjuntiva bulbar a fim de identificar as alterações citológicas que ocorrem antes do aparecimento dos sinais clínicos da xeroftalmia. A validade do método tem sido estabelecida através de vários estudos (AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1987; AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1988; LUZEAU *et al.*, 1988; NATADISASTRA *et al.*, 1988; CARLIER *et al.*, 1989; GADOMSKI *et al.*, 1989; CARLIER *et al.*, 1990; CARLIER *et al.*, 1991a; CARLIER *et al.*, 1992).

Considerando que no Município de Campinas, SP, não existem estudos populacionais sobre a deficiência de vitamina A e levando em conta a potencial vantagem da técnica de CICO, decidimos utilizar essa metodologia para determinar a prevalência de hipovitaminose A em crianças residentes nas favelas dessa Cidade. Além disso, até a data de início do trabalho, não existiam relatos sobre o uso da técnica de CICO no Brasil.

Para uma demonstração mais evidente da relação entre a técnica de CICO e o estado carencial comparamos os dados da impressão ocular com os resultados das dosagens de retinol no soro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Assim, acreditamos que os resultados alcançados nesta pesquisa contribuirão na caracterização da região em termos de hipovitaminose A, além de poder verificar a utilidade do teste de CICO em estudos com crianças brasileiras.

2. OBJETIVOS

- Determinar a prevalência de hipovitaminose A, em crianças de 3 e 10 anos de idade, residentes em favelas do Município de Campinas, São Paulo;

- Comparar a avaliação obtida pela citologia de impressão da conjuntiva ocular (CICO) com os níveis séricos de retinol, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Vitamina A: generalidades e funções

O termo vitamina A compreende dois grupos de compostos nutricionais que compõem a dieta. Um deles envolve os vários tipos de vitamina A pré-formada (retinol, ésteres de retinol, retinaldeído, ácido retinóico e alguns isômeros), e o outro as pró-vitaminas A: carotenóides que dão origem à vitamina.

Nos alimentos, a vitamina A está presente, na forma de éster de retinol ou de pró-vitamina A. Os ésteres de retinol são encontrados naturalmente nos alimentos de origem animal, sendo o leite integral e derivados, vísceras e gema do ovo as principais fontes, podendo ainda estar presentes em alguns alimentos industrializados enriquecidos. Por outro lado, as pró-vitaminas A (sob a forma de carotenóides com atividade de vitamina A) predominam nos vegetais, em hortaliças verde-escuros e frutos de cores amarelo-alaranjado.

A ausência de vitamina A na dieta ou o baixo consumo de alimentos-fonte por tempo prolongado leva ao estado de carência. Esta condição, sem dúvida, é a principal responsável pelo desencadeamento da hipovitaminose A em populações de países em desenvolvimento. Portanto, a melhor defesa é uma adequada oferta da vitamina ou de pró-vitamina A na dieta. No Brasil, já foi bem documentado que o consumo dessa vitamina é insuficiente (ICNND, 1965; IBGE, 1982).

A ausência ou a redução dos lipídeos na alimentação também é fator importante na etiologia da hipovitaminose A. O baixo consumo de lipídeos leva a uma redução na absorção tanto de vitamina pré-formada, quanto de carotenóides. Em regiões onde a deficiência de vitamina A é comum, a ingestão de lipídeos chega a ser inferior a 5g/dia (DeLUCA *et al.*, 1979).

No intestino, os ésteres da vitamina são hidrolisados para retinol e ácidos graxos. O β -caroteno é convertido em retinol, sob ação de enzimas específicas presentes na mucosa intestinal. Após absorção, o retinol é reesterificado, principalmente com o ácido palmítico, incorporado aos quilomicrons, e transportado para o fígado onde é estocado nas células parenquimais para uso posterior pelo organismo (BONDI & SKLAN, 1984). Do fígado, a vitamina A é mobilizada e transportada para os tecidos periféricos por um sistema que envolve duas proteínas, "retinol-binding-protein" (RBP) e uma pré-albumina (SMITH & GOODMAN, 1979). Sob condições fisiológicas normais, cerca de 90% do total de vitamina A presente no plasma está ligada à RBP. Provavelmente, 8% do retinol circulante está ligado às lipoproteínas de baixa densidade, enquanto que uma pequena fração encontra-se na forma de ácido retinóico. Os valores normais de vitamina A no sangue são de 50 e 57 μ g/100ml em homens e mulheres, respectivamente, com um coeficiente de variação na faixa de 20 a 30%, atribuídos a variações fisiológicas normais (OLSON, 1984). Na França, o teor de retinol plasmático, em média, para crianças de 1 a 16 anos é de $42,05 \pm 12,0 \mu\text{g/dl}$, sendo $43,0 \pm 13,0 \mu\text{g/dl}$ para os meninos e $41,8 \pm 10,7 \mu\text{g/dl}$ para as meninas (MALVY *et al.*, 1989). Para uma população normal a curva de distribuição do retinol plasmático varia de 20 a 80 μ g/100ml. No Senegal, o valor médio de retinol no plasma de crianças menores de 6 anos, nas regiões de Fatick e Djourbel, é de 14 μ g/100ml, apresentando uma curva de distribuição com concentrações variando de 1 a 60 μ g/100ml (AMÉDÉE-MANESME & De MAEYER, 1989).

A vitamina A está envolvida em muitas funções no organismo. Desde 1930, quando foi reconhecida como um nutriente essencial para o homem, tem sido comprovada a sua participação na visão, crescimento, reprodução, manutenção e desenvolvimento dos epitélios, secreção de muco, funcionamento normal das células e função imune (DOWLING, 1960; OLSON, 1972; SMITH & GOODMAN, 1979; BONDI & SKLAN, 1984; BENDICH & LANGSETH, 1989). Atualmente, as evidências sugerem o papel da vitamina A na prevenção de vários tipos de câncer (WILLET *et al.*, 1984). Em concordância também KNERT *et al.* (1990) demonstraram forte associação entre altos

níveis de retinol no soro e o baixo risco de desenvolvimento de câncer, especialmente entre os homens.

Enquanto o retinol é requerido para a reprodução, seu metabólito (retinal) é a forma ativa no processo da visão. Nos olhos, já está bem estabelecido que a vitamina A (retinal) é necessária para a visão no escuro e, possivelmente, para a percepção das cores (ZILE & CULLUM, 1983). O ácido retinóico, outro metabólito, é inativo neste processo, mas é atualmente reconhecido como um mediador fundamental no processo de diferenciação e proliferação celular. A exata natureza do papel da vitamina A em nível molecular em muitas de suas funções, ainda não está totalmente esclarecida, com exceção de seu papel na visão.

Nos olhos, a carência de vitamina A produz como alteração inicial diminuição da sensibilidade da retina à luz, prejudicando a adaptação ao escuro e ocasionando a cegueira noturna (hemeralopia) (DOWLING, 1960). Na fase inicial aparecem também lesões externas destrutivas dos epitélios da conjuntiva ocular e, em fase posterior, da córnea (xeroftalmia) (WILSON *et al.*, 1980). A deficiência de vitamina A, quando acentuada, pode conduzir à cegueira parcial ou total, de forma irreversível.

No processo normal de diferenciação das células epiteliais, a vitamina A tem um papel essencial. MORI (1922), foi o primeiro a reconhecer as transformações epiteliais que ocorrem na deficiência de vitamina A, classificando-as como ceratinização, e propondo que a xeroftalmia é decorrente do ressecamento do epitélio (xerose). Logo a seguir, WOLBACH & HOWE (1925), reconheceram que as células secretoras de muco são substituídas por células ceratinizadas na deficiência de vitamina A. Também, GOLDBLATT & BENISCHEK (1927) definiram as alterações do epitélio como um processo de metaplasia dos epitélios cuboide e colunar para um tipo ceratinizado escamoso. WOLBACH & BESSEY (1942), afirmaram que há uma sequência de transformações, constituída por atrofia do epitélio, proliferação reparadora de células basais, crescimento e diferenciação de novas camadas celulares em epitélio ceratinizado estratificado. Mais recentemente, ONG & CHYTIL (1975), confirmaram que a deficiência de vitamina A leva à transformação do epitélio colunar normal para o tipo escamoso estratificado. Essas alterações são perfeitamente observadas na conjuntiva do olho, traquéia, pele e de muitos outros órgãos (ONG & CHYTIL, 1975; BAUERFEIND, 1986).

Para explicar o modo de ação da vitamina A no processo de crescimento e diferenciação celular há dois modelos propostos. Num deles, a vitamina A atuaria como coenzima no transporte de açúcares para síntese de glicoproteínas específicas, que estariam envolvidas na expressão gênica (DeLUCA, 1977; DeLUCA *et al.* 1979; BAUERFEIND, 1986); e no outro a vitamina estaria envolvida diretamente, via proteína receptora, no controle da expressão genética (ZILE & CULLUM, 1983; GOODMAN, 1984; BAUERFEIND, 1986).

Muitos estudos realizados em nível de experimentação animal confirmam o envolvimento da vitamina A na expressão gênica. PORTER *et al.* (1986), por exemplo, demonstraram diminuição significativa na síntese de RNA em animais submetidos à dieta sem vitamina A, sendo que a influência do retinol no processo de transcrição do DNA deve-se, em grande parte, à ação direta da vitamina no núcleo da célula.

As mais recentes descobertas tornam evidentes o papel da vitamina A no controle da cadeia de genes via receptor nuclear. Neste caminho, a vitamina A regula o crescimento e o metabolismo, agindo em sinergismo com o hormônio da tireoide (T₃), ativando o gene responsável para a produção do hormônio de crescimento (BEDO *et al.*, 1989; WOLF, 1990).

Até bem pouco tempo, a deficiência de vitamina A era mais conhecida pelos danos oculares que ocasionava, já que muitas crianças no mundo ficaram cegas em consequência dessa deficiência. Outras recentes descobertas demonstraram ser a vitamina A um fator que predispõe ao aumento e severidade das infecções (SOMMER *et al.* 1987; SOMMER, 1989a) e às anemias (SOMMER, 1989b). Em um estudo longitudinal de aproximadamente 4000 crianças, SOMMER *et al.* (1984), verificaram que o risco de desenvolver doença respiratória e diarreia foi muito maior no grupo de crianças com xeroftalmia do que naquelas sem xeroftalmia, independente da idade e do estado nutricional. De acordo com SOMMER *et al.* (1983), crianças com xeroftalmia leve apresentavam coeficientes de morbidade e mortalidade maior do que crianças clinicamente normais. Há fortes evidências de que o efeito da deficiência de vitamina A na mortalidade infantil pode ser revertido pela suplementação com a vitamina (SOMMER *et al.*, 1983; SOMMER *et al.*, 1986). A suplementação demonstrou reduzir a mortalidade em crianças com xeroftalmia leve, sugerindo que a deficiência subclínica de vitamina A pode ter um impacto na mortalidade das populações em idade pré-escolar de países em desenvolvimento (SOMMER *et al.*, 1983). Embora os estudos realizados por SOMMER

relatarem reduções significativas nos coeficientes de mortalidade após suplementação com vitamina A, outros consideram superestimado o efeito protetor da vitamina A na morbidade e mortalidade na infância (COSTELO, 1986; MARTINEZ *et al.*, 1986).

Entretanto, outros autores também encontraram associação entre os níveis circulantes da vitamina e os coeficientes de mortalidade na infância. RAHMATHULLAH *et al.* (1990), confirmaram uma queda de até 54% nos coeficientes de mortalidade infantil no Sul da Índia, após suplementação com vitamina A. O efeito do suplemento vitamínico A na redução da morbidade e da mortalidade de crianças com sarampo e outras doenças infecciosas foi demonstrado também por COUTSODIS *et al.* (1991) e VITAMIN A... (1991).

A interrelação deficiência de vitamina A e anemia ainda não está muito bem elucidada. No entanto, as evidências sugerem que a anemia pode ser causada pela deficiência de vitamina A (HODGES *et al.*, 1978; MEJIA *et al.*, 1979). Apesar dos baixos níveis de ferro no soro, a anemia associada com a carência de vitamina A parece não responder ao tratamento com suplemento de ferro, ao contrário do que acontece quando a vitamina A é também administrada (HODGES *et al.*, 1978). Em outro estudo de suplementação, na Guatemala, cerca de 100 crianças receberam 10.000 UI/dia de vitamina A e/ou 3mg de ferro/dia por kg de peso, durante dois meses. Foi confirmada uma melhora acentuada nos níveis de ferro circulantes, principalmente entre as crianças suplementadas com ferro e vitamina A, mostrando haver uma forte interação biológica entre estes dois nutrientes (MEJIA & CHEW, 1988; VITAMIN A..., 1989; BLOEM *et al.*, 1990a).

3.2. Indicadores do estado nutricional de vitamina A

Muitos métodos são disponíveis para diagnosticar a deficiência de vitamina A em populações humanas. Entretanto, a maioria deles não é prático, e não recomendável para o diagnóstico precoce da carência de vitamina A, apresentando limitações para serem usados em pesquisas de campo.

3.2.1. Indicadores clínicos

O diagnóstico clínico é baseado no exame ocular e extraocular, buscando encontrar os sinais sugestivos da deficiência de vitamina A.

Dentre as manifestações clínicas que caracterizam a deficiência de vitamina A, as alterações oculares são as mais bem conhecidas e, provavelmente, de maior frequência. Os clássicos sinais e sintomas desta deficiência são manifestações dos estados intermediário e avançado, e de pouco valor na detecção do estado inicial. Em estudos epidemiológicos, os sinais clínicos comumente empregados são a xerose conjuntival, com ou sem mancha de Bitot (X1B e X1A), xerose da córnea (X2), ulceração da córnea com xerose (X3A), ceratomalácia (X3B) e cicatriz da córnea (XS) (OLSON, 1978; SOMMER *et al.*, 1980; WHO, 1982).

A xerose conjuntival é um dos sinais mais precoces da deficiência de vitamina A, mas não é sempre facilmente detectável. A mancha de Bitot, por outro lado, embora seja fácil de detectar não é sempre indicativa da deficiência da vitamina (REDDY *et al.*, 1989). Para o diagnóstico das fases iniciais da xeroftalmia, MOURIQUAND *et al.* (1930) recomendaram o uso da lâmpada de fenda e, mais tarde, SWEET & K'ANG (1935) propuseram a raspagem do epitélio. SAUTER, citado por WILSON & RONCADA (1985), sugeriu o corante vital Rosa Bengala para o reconhecimento precoce da xeroftalmia, recomendando seu uso em trabalhos de campo. Algumas pesquisas realizadas com o uso deste corante para identificação dos sinais iniciais de xeroftalmia foram realizadas no Brasil, inicialmente por WILSON *et al.* (1978), RONCADA (1979) e posteriormente, WILSON & RONCADA (1985). Apesar destes Autores terem alcançado bons resultados com o corante Rosa Bengala, seu uso em pesquisas de campo é ainda limitado por falta de padronização e aparecimento de muitos casos de falsos positivos e falsos negativos, em relação aos níveis séricos de retinol. FAVARO *et al.* (1986b) não encontraram correlação entre os resultados alcançados com o Rosa Bengala e os níveis plasmáticos de retinol. Outros pesquisadores também apontam discrepâncias nos resultados do teste do Rosa Bengala usado no diagnóstico da deficiência de vitamina A (KUSIN *et al.*, 1977; KUSIN *et al.*, 1979).

Os sinais mais leves e precoces da deficiência de vitamina A, como fotofobia, ardência e dor nos olhos são sutis, inespecíficos, difíceis de medir e padronizar

e, embora possam servir para sugerir deficiência, são evidências insuficientes para o diagnóstico dos casos iniciais (YOUMANS *et al.*, 1938).

Para a Organização Mundial de Saúde-OMS (WHO, 1982) os sinais clínicos cutâneos e a xerose conjuntival não são critérios para determinar a prevalência de hipovitaminose A em nível de população, pois são sinais extremamente variáveis e inespecíficos. Nos primeiros anos de vida há um escasso desenvolvimento dos folículos pilosos (COSTA, 1953b), o que torna as alterações dermatológicas inconstantes ou não comuns em crianças (YOUMANS *et al.*, 1938; COSTA, 1953b; WHO, 1982).

3.2.2. Indicadores funcionais

Os mais utilizados são o teste de adaptação à obscuridade, a eletroretinografia e a biomicroscopia, podendo ainda ser empregado o exame de fundo de olho.

Como a cegueira noturna manifesta-se nos estágios iniciais da carência de vitamina A (SOMMER *et al.*, 1980; WILSON & RONCADA, 1985) a prova de adaptação à obscuridade já foi muito empregada no diagnóstico precoce desta carência. Alguns estudos sugerem que é uma forma segura de avaliar a deficiência de vitamina A, mesmo nas suas formas mais leves (FRANDSEN, 1935; JEGHERS, 1937). O diagnóstico é feito pela determinação do mínimo de luz que o indivíduo pode perceber, sendo entretanto requerido o uso de instrumentos especiais, caros e difíceis de serem empregados no campo. Esses métodos apresentam resultados duvidosos quando aplicados em crianças e, embora tenham sido propostas modificações em situações de campo, são de difícil diagnóstico (WHO, 1976; BATISTA, 1969; SOMMER *et al.*, 1980; UNDERWOOD, 1990b). Considerando estas dificuldades, o diagnóstico de cegueira noturna pode ser feito com base no histórico apresentado pela mãe, e apesar de já ter sido empregado com algum sucesso na Indonésia (SOMMER *et al.*, 1980), o valor do método depende do vocabulário típico regional sobre o grau em que a cegueira noturna é reconhecida pela comunidade (WHO, 1982; UNDERWOOD, 1990a; UNDERWOOD, 1990b).

Assim como o teste de adaptação ao escuro, a eletroretinografia também se baseia no estudo funcional da retina, determinando-se o nível de rodopsina e sua velocidade de regeneração (RIPPS, 1982). É uma técnica de difícil aplicação em pesquisas de campo por requerer o uso de aparelhos sofisticados. Além disso, não é

indicada para menores de 6 anos, justamente o grupo onde a deficiência de vitamina A é mais grave e comum (BATISTA, 1969; OLSON, 1978).

A biomicroscopia como meio de investigar a carência de vitamina A já foi considerada útil, simples e objetiva. Para KRUSE (1942), a biomicroscopia, tem a vantagem de identificar lesões precoces do globo ocular, e permite uma observação perfeita de manchas da conjuntiva bulbar, através de microscópio binocular e um adequado sistema de iluminação. Entretanto, a biomicroscopia não teve boa aceitação devido à contestação dos resultados de KRUSE (1942) por outros Autores (COLLISON, 1942; ANDERSON & MILAN, 1945), e por falta de confiabilidade de seus resultados não é recomendada para o diagnóstico precoce da deficiência de vitamina A (COSTA, 1953a).

Na deficiência de vitamina A acentuada e prolongada os quadros normais de fundo de olho (fundo pigmentado) são substituídos pelo descoramento do fundo e aparecimento de pequenas manchas brancas, que geralmente regredem após administração de vitamina A (MOURA CAMPOS, 1943; WHO, 1976). Na criança, entretanto, as alterações do fundo de olho produzidas pela deficiência de vitamina A não são precoces e nem frequentes. Mesmo em casos onde há graves manifestações clínicas da carência, o exame de fundo de olho é quase sempre negativo, e, por isso, é de pouco valor no diagnóstico em fase subclínica. (COSTA, 1953a).

3.2.3. Inquéritos alimentares

Os inquéritos alimentares são baseados na estimativa do consumo de alimentos-fonte da vitamina A pré-formada e de pró-vitamina A. Os inquéritos alimentares, quando cuidadosamente aplicados, permitem sugerir sobre o estado nutricional de vitamina A (OLSON, 1978; UNDERWOOD, 1990b). Porém, os cálculos do consumo de vitamina A pré-formada e pró-vitamina A, podem ser inadequados por envolver o uso de tabelas de composição de alimentos que variam com sua procedência e não definem a verdadeira composição dos alimentos (WHO, 1976; OLSON, 1982; WHO, 1982; SANTOS, 1988; BATISTA FILHO, 1989). As tabelas contêm a composição do alimento cru, e não leva em conta as perdas por processamento, preparo, estocagem e digestibilidade (FERRANDO, 1987). Por outro lado, a atividade da vitamina A encontrada em diversas tabelas é expressa, com frequência, em unidades diferentes, o que dificulta a identificação das fontes alimentares com maior valor vitamínico A (BOOT *et al.*, 1992). Vale a pena lembrar, que o teor de carotenóides varia com a espécie, clima,

estado de maturação, armazenamento e técnicas de preparo (OLSON, 1982; RODRIGUEZ-AMAYA, 1990).

Nos últimos anos têm surgido metodologias que utilizam inquéritos dietéticos mais simples para avaliar a quantidade de vitamina A na dieta. Porém, ainda há necessidade de se determinar sua sensibilidade e especificidade. Contudo, os questionários permanecem condicionados ao uso de tabelas de composição de alimentos e meios adequados para quantificar os alimentos consumidos.

3.2.4. Indicadores Bioquímicos

Estes indicadores apresentam grande importância porque precedem as alterações clínicas e, portanto, são mais úteis para detectar casos precoces. Entre eles, os mais comumente usados medem os níveis hepáticos ou séricos de retinol.

3.2.4.1. Concentração de retinol no fígado

Classicamente o fígado tem sido apontado como o órgão de armazenagem da vitamina A no organismo animal e, portanto, como o órgão ideal para se determinar as reservas corpóreas. Segundo BLOMHOFF *et al.* (1988), mais que 90% do total da vitamina se encontram localizados no fígado. Estudos mais recentes (BLOMHOFF *et al.*, 1991), entretanto, revelam que essa situação se aplica somente em casos de nutrição adequada ou hipervitaminose A; ou seja, casos em que a concentração se estima superior a 300 µg/g. Já nos casos de deficiência outros órgãos, como pulmão, gônadas, rins, etc. podem conter maiores concentrações de vitamina A do que o próprio fígado. A reserva hepática é considerada deficiente quando o teor de retinol é inferior a 20 µg/g de tecido. Um armazenamento de 20 µg/g é esperado dar proteção para cerca de 100 dias (OLSON, 1978) em casos de aporte alimentar nulo, impedindo o aparecimento dos sinais de hipovitaminose A (WHO, 1982).

Estas considerações aliadas ao fato da dosagem hepática de vitamina A ser praticada apenas em condições de hospitalização, inviabilizam a utilização deste método em nível de populações.

3.2.4.2. Níveis sanguíneos de retinol

Os valores séricos ou plasmáticos de retinol constituem os indicadores mais comumente utilizados para avaliar o estado nutricional de vitamina A.

Já existe suficiente demonstração de que, no homem o nível sanguíneo de vitamina A, em condições normais, se mantém estável, embora seja muito variável de um indivíduo para outro. Após ingestão de doses elevadas, dessa vitamina, há uma nítida elevação do seu nível plasmático dentro de poucas horas (GLOVER *et al.*, 1978; LOERCH *et al.*, 1979; GARRETT-LASTER *et al.*, 1981). A magnitude da resposta plasmática e o tempo em que os níveis de vitamina A permanecem elevados dependem da dose e do nível de reserva hepática (DeLUCA *et al.*, 1979). Por outro lado, redução ou completa ausência da ingestão de vitamina A não modifica logo o teor sanguíneo da vitamina no homem com níveis hepáticos normais. São precisos alguns meses de supressão desse nutriente na alimentação, para que ocorra uma queda sensível da vitamina A no sangue (DOWLING & WALD, 1958; McLAREN, 1966; OLIVEIRA *et al.*, 1990).

É sabido que o organismo humano armazena grandes quantidades de vitamina A no fígado, o qual libera parte de seu depósito para manter o nível plasmático da vitamina. Mais de 90% da vitamina A circulante se encontra na forma de um complexo, retinol:RBP (1:1), o qual é sintetizado e secretado pelos hepatócitos. Dentro do intervalo normal dos níveis de armazenamento hepático de vitamina A (20 a 300 µg/g de fígado), a concentração plasmática da vitamina é controlada por mecanismos homeostáticos (OLSON, 1984). Dentro destes limites os níveis de retinol no sangue não se correlacionam com a quantidade de vitamina A armazenada no fígado (PILCH, 1987). É por essa razão que os níveis de retinol no soro não são bons indicadores das reservas totais de vitamina A no corpo (OLSON, 1984). SUTHUTVORAVOOT & OLSON (1974) encontraram pessoas com níveis baixos de vitamina A no sangue mas apresentando reservas normais da vitamina no fígado. Contudo, nas situações extremas, quando as concentrações de retinol no soro são muito baixas < 0,35 µmol/L (<10 µg/dl) ou muito altas > 1,4 µmol/L (>40 µg/dl), as dosagens séricas de retinol possuem especial valor como indicador do estado nutricional em vitamina A (LOOKER *et al.*, 1988; TANUMIHARDJO *et al.*, 1990; UNDERWOOD, 1990a; UNDERWOOD, 1990b). Um nível muito baixo de vitamina A no plasma (< 10 µg/dl), além de ser um reflexo de

escassas reservas da vitamina no fígado, notadamente já está associado com outras manifestações clínicas da deficiência. Desta forma, o uso combinado de sinais clínicos com a dosagem bioquímica para diagnosticar a carência de vitamina A fornece uma informação mais segura e confiável do que cada um usado isoladamente.

Apesar da limitação intrínseca como indicador individual, é válido usar a dosagem do retinol sanguíneo para estudar a distribuição dos vários graus de hipovitaminose A numa população (PILCH, 1987; LEWIS *et al.*, 1990; UNDERWOOD, 1990b), desde que a interpretação dos resultados seja feita com cautela, principalmente, quando os níveis de vitamina A encontram-se distribuídos entre 10 e 20 µg/dl. Os níveis de retinol no sanguíneo são afetados pelo estado fisiológico e nutricional do indivíduo: por exemplo, na infestação parasitária, consumo inadequado de proteínas, lipídeos ou de zinco, síndromes de má absorção, doenças hepáticas, distúrbios no mecanismo regulador, entre outros fatores (WHO, 1976; DeLUCA *et al.*, 1979; OLSON, 1984). A relação que existe entre estado nutricional e níveis de vitamina A no sangue já está bem documentada e é amplamente aceita. Níveis de vitamina A mais altos são encontrados em indivíduos bem nutridos e de condição sócio-econômica elevada (BLOEM *et al.*, 1989).

Convencionalmente, valores inferiores a 20 µg/dl (<0,70 µmol/L) são considerados baixos, e valores inferiores a 10 µg/dl (<0,35 µmol/L) são considerados deficientes. Quando 15% da população está com níveis baixos, e/ou 5% com níveis deficientes, existe um problema de Saúde Pública (ARROYAVE *et al.*, 1981).

A análise do retinol plasmático envolve um processo de extração relativamente simples. Basicamente, trata-se de precipitar a proteína plasmática e extrair o retinol com um solvente orgânico adequado. A determinação da concentração de retinol nesta solução orgânica, tem sido feita por fluorimetria, colorimetria ou pela absorção direta de luz ultra-violeta (325-330nm), com ou sem o auxílio de separação cromatográfica (CLAE).

Durante os últimos anos têm se registrado um número significativo de avanços na detecção e quantificação de vitamina A. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se tornado um instrumento efetivo para esta finalidade, apresentando numerosas vantagens, entre elas: especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez, e menor risco de degradação da vitamina. Nos dias atuais, o uso da CLAE com detecção por absorção a 325nm é o procedimento preferido em

laboratórios modernos (ARROYAYE *et al.*, 1981; WHO, 1982; OLSON, 1984). No entanto, o alto custo do equipamento, a utilização de solventes de alto grau de pureza, e necessidade de técnicos altamente capacitados, restringem e inviabilizam o uso da CLAE em regiões onde os recursos são escassos.

3.2.4.3. Método da resposta relativa a uma certa dose de retinol (RDR)

O método da resposta relativa a uma certa dose (450µg) de palmitato ou acetato de retinila (RDR), também utiliza dosagens plasmáticas de retinol. Este teste se baseia na liberação da apo-RBP ("retinol binding protein" sem o retinol), que se acumula no fígado durante os estados marginal e de deficiência da vitamina A (MUTO *et al.*, 1972; SMITH & GOODMAN, 1979), sendo liberada como holo-RBP (RBP com retinol ligado) quando a vitamina A torna-se disponível. O teste é considerado positivo (indicando reservas hepáticas insuficientes) se o aumento do retinol sérico da primeira para a segunda dosagem é maior ou igual a 20% (AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1984; FLORES *et al.*, 1984).

Embora o método de RDR tenha apresentado bons resultados em seres humanos, e tenha sido utilizado com sucesso em estudos de campo (FLORES *et al.*, 1984), o mesmo é de aplicação limitada por requerer duas amostras de sangue e um intervalo de 5 horas entre as coletas. Para minimizar esse problema, recentemente a técnica de RDR foi modificada pela substituição do acetato de retinila pelo 3,4-desidroretinol (100 µg/kg) que é dado oralmente 4 a 8 horas antes da coleta de sangue. Este novo procedimento, chamado RDR modificado, requer apenas uma coleta de sangue porque o desidroretinol não afeta os níveis de retinol no soro (TANUMIHARDJO *et al.*, 1987) mas é similarmente ligado ao RBP; entretanto, tem o inconveniente de não estar disponível comercialmente (TANUMIHARDJO *et al.*, 1990), e requerer a CLAE para resolução das duas formas de vitamina A (UNDERWOOD, 1990b; WOLDE-GEBRIEL *et al.*, 1991).

3.2.4.4. Método de Diluição Isotópica

O uso de isótopos para estimar as reservas de vitamina A do corpo começa a ser testado em humanos. O princípio desta técnica é baseado na administração da vitamina A marcada (tetradeutério de vitamina A) por via intravenosa, que se mistura com a vitamina A do corpo. A diluição do tetradeutério no sangue é relativa à quantidade administrada, sendo usado para calcular o "pool" de vitamina A do corpo (BERGEN *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1990; UNDERWOOD, 1990b). Esta metodologia, apesar de ter se mostrado promissora, devido a boa correlação com os valores de retinol no fígado, requer um investimento elevado, encontra dificuldade na obtenção de isótopos, necessita de instrumentos sofisticados e técnicos altamente especializados, o que limita o seu uso em pesquisas epidemiológicas (FURR *et al.*, 1989; UNDERWOOD, 1990a).

3.2.5. Indicadores Citológicos

3.2.5.1. Índice de ceratinização (IC)

Considerando a presença constante de alterações nos epitélios produzidas pela deficiência de vitamina A, já em 1933 BLACKFAN & WOLBACH encontraram células epiteliais ceratinizadas em esfregaços da conjuntiva, mucosas do nariz, boca, vagina, traquéia e brônquios em pacientes com hemeralopia. Da mesma forma, SWEET & K'ANG (1935) também evidenciaram a presença de células ceratinizadas em esfregaços da conjuntiva e mucosas, numa tentativa de estabelecer um método prático e seguro para o diagnóstico dos primeiros sinais da deficiência de vitamina A.

Partindo dessas observações, MOURA CAMPOS (1945), no Brasil, verificou que a proporção de células epiteliais normais (nucleadas) e ceratinizadas variava do rato normal para o submetido à dieta deficiente em vitamina A. Em consequência, passou a contar todas as células do esfregaço, e a relação células normais/células ceratinizadas denominou de Índice de Ceratinização (IC). Os esfregaços eram feitos com pequeno chumaço de algodão enrolado em estilete e umedecido em soro fisiológico, e a lâmina corada pelo método de Papanicolau. Os ratos normais tiveram IC médio de $0,85 \pm 0,15$, enquanto que para os animais carentes, os IC variaram entre 1,9 e 5,5. Em função disso, o Autor propôs que o Índice de Ceratinização da conjuntiva bulbar alto constituía um sinal evidente e precoce da deficiência de vitamina A.

Em seguida, NOGUEIRA JUNIOR (1950) confirmou os achados de MOURA CAMPOS (1945), estabelecendo o valor normal médio do IC de $0,66 \pm 0,19$ para ratos. Seguindo a mesma técnica em estudos com humanos, o Autor estabeleceu o valor normal médio do IC em $0,30 \pm 0,08$, e considerou qualquer valor acima de 0,54 como indicador do estado de deficiência de vitamina A.

No confronto dos resultados do IC com o teor sanguíneo de vitamina A, COSTA (1953a) encontrou concordância em quase todas as crianças com baixos níveis de retinol sérico e manifestações evidentes da deficiência de vitamina A. Por outro lado, nas investigações de formas subclínicas da deficiência da vitamina, o IC mostrou-se de pouco valor. Na opinião de COSTA, o método pode ser positivo em indivíduos sem suspeita de deficiência de vitamina A, e negativo em outros com manifestações clínicas evidentes. Tal conclusão veio corroborar os achados de YOUMANS *et al.* (1938), que consideraram os exames de esfregaços do globo ocular de pouco valor para o diagnóstico das formas leves da deficiência de vitamina A.

3.2.5.2. Citologia de Impressão Citológica da Conjuntiva Ocular (CICO)

A conjuntiva ocular é uma mucosa fina e transparente que recobre a esclera. O epitélio normal da conjuntiva é caracteristicamente colunar estratificado, composto de três camadas de células. Uma camada profunda de células colunares, uma camada média poligonal e uma camada superficial de células epiteliais achatadas ou cuboides baixas (MORI, 1922). Por todo o epitélio da conjuntiva há células caliciformes ("goblet cells"). KESSING (1968) demonstrou que a densidade das células caliciformes varia sobre a superfície do globo ocular, sendo maior na região inferonasal.

As células caliciformes são verdadeiras glândulas unicelulares especializadas na secreção de muco. O muco é um lubrificante espesso contendo glicoproteínas que mantém a integridade da superfície do globo ocular.

Sob condições normais as células epiteliais da conjuntiva estão constantemente umedecidas por suas secreções. Entretanto, quando há pouca vitamina A, as células epiteliais desenvolvem metaplasia, substituindo integralmente o epitélio normal para o tipo escamoso estratificado não secretório, que é caracterizado por uma

ceratinização. O fenômeno clínico é descrito pelo termo geral de xerofthalmia (TSENG *et al.*, 1984; TSENG, 1985).

As alterações nas células epiteliais ocorrem relativamente cedo, de acordo com os estudos de BLACKFAN & WOLBACH (1933). Ratos alimentados com dieta deficiente em vitamina A apresentam inicialmente ceratinização da camada externa de células epiteliais da conjuntiva bulbar, levando à xerose conjuntival, xerose corneal e palpebral. Com o avanço da doença, o processo de ceratinização se estende por toda a conjuntiva (MORI, 1922).

EGBERT *et al.* (1977), foram os primeiros a relatar que as células da conjuntiva do globo ocular poderiam ser coletadas pelo rápido contato de um simples pedaço de papel de acetato de celulose. A partir daí, vários autores passaram a utilizar essa técnica para estudar as alterações morfológicas das células da conjuntiva do olho.

SOMMER *et al.* (1981a) e SOMMER & GREEN (1982) demonstraram a relação entre o número de células caliciformes e o estado nutricional em vitamina A. Notaram eles que as células caliciformes reapareciam na conjuntiva das crianças com xerose conjuntival após 2 semanas de tratamento com vitamina A, atingindo-se uma concentração normal dentro de um mês. Estas mesmas observações já haviam sido relatadas por SULLIVAN *et al.*, em 1973.

Em trabalho posterior, SOMMER (1983) demonstrou ausência total de células caliciformes durante a deficiência de vitamina A. Um ano depois, utilizando papel de filtro em estudo experimental com coelhos deficientes em vitamina A, HATCHEL & SOMMER (1984) confirmaram as alterações morfológicas das células epiteliais e a redução gradual no número de células caliciformes, à medida que reduzia os níveis de retinol no soro. As alterações citológicas ocorriam antes mesmo dos sinais clínicos aparecerem. Essas constatações serviram de embasamento para a CICO como teste promissor para o diagnóstico precoce da deficiência de vitamina A, podendo ser de muita utilidade em pesquisas de campo. Ao contrário dos métodos existentes, a CICO é simples, barata, não invasiva e atramáutica (KJOLHEDE *et al.*, 1989; CARLIER *et al.*, 1992).

Logo após, WITTPENN *et al.* (1986) resolveram experimentar a CICO em crianças na Índia. De 13 crianças com xerofthalmia leve, 12 mostraram completa ausência de células caliciformes, alargamento das células epiteliais e ceratinização. Para

uma demonstração mais evidente da relação entre estas alterações e o estado nutricional de vitamina A, submeteram essas crianças ao tratamento com dose única de 100.000 UI de vitamina A, e em todas as amostras reapareceram as células caliciformes com células epiteliais pequenas e normais, confirmando as observações de HATCHELL & SOMMER (1984). Nas suas conclusões WITTPENN *et al.* (1986) confirmaram a utilidade do teste citológico.

Uma outra contribuição importante para o estudo da impressão ocular foi o trabalho de AMÉDÉE-MANESME *et al.* (1988). Para essa pesquisa, os Autores utilizaram crianças com hepatopatias diversas, nas quais era admissível algum estágio carencial de vitamina A. Um grupo foi tratado com injeção intramuscular de 100.000 UI de palmitato de retinila, os valores de retinol no soro e de RDR eram normais, e todos tinham citologia normal com abundantes células caliciformes e células epiteliais nucleadas normais. Nas crianças que não receberam terapia de vitamina A, os Autores encontraram valores de RDR anormais, baixa concentração hepática da vitamina, citologia conjuntival anormal, sem células caliciformes e com células epiteliais alargadas e separadas. Os níveis de retinol no soro do segundo grupo também estavam baixos, inferiores a 15µg/dl (0,52 µmol/L). Sugeriram, tais Autores, classificar as alterações citológicas considerando apenas a presença (normal), ou ausência de células caliciformes (anormal), sem levar em conta as modificações morfológicas epiteliais. Disseram, também, que a CICO é um diagnóstico de carência de vitamina A sensível e específico quando usado para distinguir entre crianças normais e em estado pré-clínico da deficiência de vitamina A. Foi sugerido o uso de uma fita de papel de celulose em tamanho maior, eliminando a necessidade de uma pinça, o que torna o procedimento mais seguro e mais rápido.

Os trabalhos mais recentes propõem a transferência das células do papel de celulose para uma lâmina, a fim de simplificar a técnica, denominando-a de citologia de impressão com transferência (CIT). As células são transferidas para a lâmina por uma simples pressão do dedo sobre o papel, e solução de Ziehl-Neelsen com 2 volumes de azul de alcian a 0,2% em ácido acético a 5%, é usada como sendo o corante mais prático. As células epiteliais são coradas em róseo e a substância mucosa em azul (AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1987; LUZEAU *et al.*, 1988). Para a validação do método, LUZEAU *et al.* (1988) compararam a CIT com a CICO. Para isto, utilizaram 40 indivíduos, 10 com deficiência de vitamina A e células caliciformes ausentes, e 30 sem deficiência de vitamina A e células caliciformes presentes, obtendo resultados semelhantes para os dois métodos.

Em apenas um caso a CIT apresentou diagnóstico errôneo porque poucas células foram transferidas para a lâmina.

A relação dos resultados da CIT com os da determinação do teor sanguíneo de vitamina A foi feito em 105 pacientes com idade média de 79 anos, sendo encontrados níveis de retinol e RBP bem mais baixos nos indivíduos que tinham CIT negativo, ou seja, células caliciformes ausentes e células epiteliais alargadas. Concordaram eles que a CIT é um bom indicador da deficiência precoce de vitamina A em estudos epidemiológicos (CARLIER *et al.*, 1989).

Também NATADISASTRA *et al.* (1987) empregaram a técnica de CICO no estudo com crianças, na Indonésia, com e sem xerofthalmia. Entre as primeiras, os níveis de vitamina A no soro diminuíram progressivamente com o agravamento das alterações citológicas. Os Autores classificaram as alterações citológicas da conjuntiva ocular em vários estágios, seguindo as recomendações de TSENG (1985). Os estágios 0 e 1, representavam citologia conjuntival normal com nível médio de retinol no soro superior a 0,70 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/dl}$). Cada estágio anormal, isto é, os estágios de 2 a 5, foi associado com níveis médios de vitamina A no soro menores que 0,70 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/dl}$). De 42 pacientes com resultados da citologia conjuntival nos estágios de 2 a 5, 40 (95%) retornaram ao estágio classificado como normal (0 e 1), após tratamento com dose única de 200.000 UI de vitamina A. Em 2 crianças a citologia conjuntival anormal progrediu do estágio 5 para o 2, e do 4 para o 2. A resposta ao tratamento variou de 2 semanas a 6 meses. Esta variação já foi registrada em estudos clínicos de pacientes com xerose conjuntival ou mancha de Bitot que requereram cerca de duas semanas a dois meses para recuperação (SOMMER *et al.*, 1981a; SOMMER & GREEN, 1982).

Ainda NATADISASTRA *et al.* (1987) demonstraram que algumas crianças recaíram na categoria anormal em seis meses, apesar do tratamento. Em adição, outras crianças que iniciaram na categoria normal passaram para categoria anormal com seis meses de tratamento. Lembrem NATADISASTRA *et al.* (1987) que PEREIRA & BEGUM (1971) já haviam referido que uma simples dose de vitamina A é insuficiente para proteger todos os indivíduos durante seis meses. Apesar do tratamento, a volta dos níveis plasmáticos de vitamina A para os níveis primitivos ocorriam entre dois e seis meses.

Em trabalho posterior, NATADISASTRA *et al.* (1988) encontraram CICO anormal em 93% das crianças com deficiência de vitamina A, definidos por critérios clínicos e bioquímicos (níveis de retinol no soro $< 20\mu\text{g/dl}$). Os Autores notaram, ainda, que a CICO foi anormal em um grande número de crianças consideradas de risco, ou seja, 46% das crianças clinicamente normais mas com níveis séricos de vitamina A $< 20\mu\text{g/dl}$, apresentaram CICO anormal. Nesse estudo a CICO foi altamente sensível (93%) e igualmente específica (94%) para a detecção da deficiência subclínica de vitamina A.

O teste de CICO foi ainda utilizado por NATARAJAN *et al.* (1990) em crianças com diarreia mas sem manifestações oculares evidentes de xerofalmia. Os Autores observaram impressão citológica anormal em 68% dos casos. Sete crianças com CICO anormal reverteram para o normal após duas semanas de terapia com 100.000 UI de vitamina A. Em face desse resultados, afirmaram os Autores que a CICO é uma técnica de grande valor para identificar casos subclínicos da deficiência de vitamina A em populações ou em grupo de alto risco, como crianças com diarreia persistente.

WITTPENN *et al.* (1988), obtiveram boa reprodutibilidade com a técnica de CICO, em estudos realizados com crianças. Para o diagnóstico da impressão citológica de 206 indivíduos, encontraram 96% de concordância, interpretados por um observador experiente e outro recentemente treinado, indicando um grau excelente de concordância entre os dois observadores.

Os estudos realizados por REDDY *et al.* (1989) trouxeram mais uma valiosa contribuição à técnica da CICO. Foi avaliado um total de 246 crianças, com idade entre 1 e 10 anos. Cerca de 25% dos casos com olhos diagnosticados clinicamente como normais apresentaram impressão citológica anormal e uma concentração média de vitamina A no sangue significativamente mais baixa do que nas crianças com impressão citológica normal. Após tratamento com a vitamina, a maioria das crianças com citologia anormal voltou ao normal. Este resultado vem confirmar que o método de CICO é um bom indicador da deficiência subclínica de vitamina A.

Em pesquisas de campo conduzidas na Guatemala por GADOMSKI *et al.* (1989), a CICO foi comparada com níveis de retinol no soro e teste da RDR. A sensibilidade da CICO foi 23% e a especificidade 80%, quando comparado com a RDR, e 26% e 81%, respectivamente, quando comparado com os níveis plasmáticos de retinol. Não houve diferença no valor médio de retinol no plasma entre os indivíduos com CICO

normal e anormal. Nessa população a técnica da impressão ocular não identificou o mesmo grupo de crianças com deficiência marginal de vitamina A diagnosticadas bioquimicamente, demonstrando baixa sensibilidade da citologia de impressão conjuntival. Outras condições patológicas, como tracoma, conjuntivite e, provavelmente, desnutrição grave e infecções sistêmicas podem limitar a sensibilidade e, até mesmo, a especificidade de CICO (UNDERWOOD, 1990a).

CARLIER *et al.* (1991a) demonstraram que o tracoma quando presente pode realmente ser um problema e confundir os resultados da CICO, levando a um grande número de falsos negativos. O tracoma, assim como a deficiência de vitamina A, induz à ceratinização das células epiteliais e, indiretamente favorece o aumento da produção de muco. Os valores de sensibilidade e especificidade empregados para a técnica CIT podem ser diferentes, dependendo do critério de classificação. Para as categorias "deficiente" e "não deficiente" (combinação dos estágios normal, marginal⁺ e marginal⁻) a sensibilidade pode ser baixa e a especificidade alta. Neste caso, a CIT é um bom indicador da deficiência de vitamina A. Para as categorias anormal (combinação dos estágios deficiente, marginal⁻ e marginal⁺) e normal, a sensibilidade pode ser mais alta e a especificidade mais baixa. Neste caso, a CIT tem o objetivo de detectar insuficiente fornecimento de vitamina A para o olho.

3.3. Prevalência de Hipovitaminose A e Xeroftalmia

De muitos séculos datam registros de lesões oculares em humanos, embora sua relação com a carência de vitamina A tenha sido estabelecida somente nas primeiras décadas deste século.

Antes mesmo do isolamento e identificação da vitamina A já se acreditava que a cura da cegueira noturna, um dos seus sintomas mais expressivos, poderia ser obtida pelo consumo de alimentos ricos nesse nutriente. No século VIII A.C., o fígado fresco de boi, de carneiro, de peixes, de porco ou de aves, já era indicado para o tratamento da cegueira noturna (PARAHYM, 1945; COSTA, 1953a; COSTA & GAMA, 1953). Hipócrates, o pai da medicina, (460-370 A.C) recomendava a ingestão de fígado de boi para combater a cegueira noturna. Muitos outros manuscritos dessa época, também mencionavam o uso do fígado de animais no tratamento e na recuperação da visão (CONDE, 1939; GAMA LOBO e GARDEIL citados por COSTA, 1953a); .

A ocorrência de hipovitaminose A era apontada como ocasional nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos e no Canadá, por exemplo, a deficiência de vitamina A foi considerada inexistente, mostrando pouca importância perante outras doenças (PEREIRA *et al.*, 1966). Entretanto, algumas pesquisas detectam uma considerável porção da população dos Estados Unidos e Canadá possuindo níveis de retinol no soro entre 10 e 20µg/100ml considerados como de risco moderado de deficiência (GOODMAN, 1984). Em adição, estudos "postmortem" têm demonstrado reservas reduzidas de vitamina A no fígado, em número significativo de indivíduos (UNDERWOOD *et al.*, 1970; RAICA *et al.*, 1972).

Já em outras partes do mundo, a deficiência de vitamina A é considerada um dos principais problemas nutricionais, afetando grande parte da população infantil de regiões em desenvolvimento (McLAREN, 1986; KUHNLEIN, 1992). De acordo com a OMS (WHO citado por UNDERWOOD, 1992), pelo menos 37 países, identificados através de critérios clínicos, tem problema de Saúde Pública. Notadamente na Indonésia (BERGEN *et al.*, 1988), Índia, (WHO, 1988), Bangladesh (COHEN *et al.*, 1987), Nepal (WEST *et al.*, 1991), Filipinas (SOMMER, 1981), Sri Lanka, Nigéria e Gana, surgem anualmente cerca de 700 mil crianças com lesões graves nos olhos, devido principalmente ao consumo inadequado de vitamina A (BRINK *et al.*, 1979). Só na Ásia, cerca de 5 milhões de crianças jovens desenvolvem xeroftalmia a cada ano, das quais cerca 250 a 500 mil ficam cegas permanentemente (SOMMER *et al.*, 1981b).

Na Índia, a deficiência de vitamina A é alta em quase todos os estados (WHO, 1982). Cerca de 20% dos casos de cegueira decorrem da deficiência de vitamina A. A prevalência dos sinais de deficiência, na região de Bhankheda do distrito de Wardha, já foi estimada em amostra de 366 crianças de 1 a 15 anos de idade, ser de 24,1% a 34,8%. A adequação da dieta para o consumo de vitamina A variou de 8 a 12% do recomendado (RDA), e não houve diferença entre crianças declaradas deficientes e não deficientes (KHAMGAONKAR *et al.*, 1990).

Em Bangladesh, onde a deficiência de vitamina A é muito frequente, e reconhecida, há muitos anos, como problema de Saúde Pública, COHEN *et al.* (1985) estimou que pelo menos 50% das crianças cegas por xeroftalmia morrem antes de completar um ano de vida.

Na Tailândia, a hipovitaminose A é um dos principais problemas nutricionais, acometendo pré-escolares em especial. Na área rural, a moléstia é considerada um problema de Saúde Pública em pré-escolares (BLOEM *et al.*, 1989; CHAROENKIATKUL *et al.*, 1985), sendo encontrados níveis séricos de retinol inferiores a 10µg/100ml em 17% desse subgrupo da população (CHAROENKIATKUL *et al.*, 1985).

A xeroftalmia é uma importante causa de cegueira nas Filipinas (SOMMER, 1981). Casos de xeroftalmia e ceratomalacia eram frequentes na província de Cebu, com a evolução de muitos casos para o óbito (SOLON *et al.*, 1979).

No Nepal, um estudo retrospectivo envolvendo cerca de 5000 crianças, de 0 a 10 anos, (HENNING *et al.*, 1991), demonstrou que a deficiência de vitamina A é uma importante causa de cegueira.

Informaram TIELSCH *et al.* (1986) que na região de Malawi (África), em 1983, a prevalência de xeroftalmia em crianças situava-se em torno de 3,9%, de um total de aproximadamente 6000 crianças menores de 6 anos. Dados mais atualizados sobre a prevalência de hipovitaminose A no continente africano foram recentemente relatados por CARLIER *et al.* (1991c). Estudando a extensão da deficiência entre pré-escolares no Senegal, os Autores encontraram 11% de prevalência de hipovitaminose A.

No Sul da Etiópia, a prevalência de xeroftalmia é superior a 5%, sendo maior em homens do que em mulheres (SOLE *et al.*, 1987). Esta diferença já havia sido observada por ROELS *et al.* (1958), que encontraram uma incidência de sintomas oculares devido à deficiência de vitamina A muito mais alta entre os homens do que entre as mulheres. A origem do risco de xeroftalmia ser maior nos homens ainda não está bem esclarecida, havendo indícios de que este risco possa ser determinado por fatores culturais, e não somente por fatores fisiológicos. Por exemplo, o tempo da amamentação e o consumo de alimentos ricos em vitamina A estão diretamente determinados por fatores culturais (SOLE *et al.*, 1987).

3.4. Prevalência de Hipovitaminose A e Xeroftalmia no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência de cegueira noturna, datam de 1648, entre os invasores holandeses no Recife (COSTA, 1953a). Em 1865 surgiram os trabalhos de Gama Lobo e de Hilário Gouvêia, pioneiros no Brasil no estudo da xeroftalmia. Os Autores apontaram a ocorrência de hemeralopia e xeroftalmia entre filhos de escravos no Rio de Janeiro que recebiam alimentação inadequada, recomendando o óleo de fígado de bacalhau no tratamento (GAMA LOBO, GAMA LOBO & GOUVEIA, citados por COSTA, 1953a). A partir daí, intensificaram-se os trabalhos experimentais, e a relação de determinadas alterações oculares com a falta do consumo de alimentos ricos em vitamina A tornou-se cada vez mais evidente.

Nos períodos de seca no Nordeste, a cegueira noturna e até casos de perda de visão já foram registrados frequentemente entre os sobreviventes (TAVARES, 1943; NIVALDO, 1955). No período de 1951 a 1954, foram relatados diversos surtos de xeroftalmia e ceratomálacia entre crianças, no Ceará, Pernambuco e Paraíba (LEÃO, 1958). Até essa época, o diagnóstico da deficiência de vitamina A era feito basicamente por meio de observações clínicas (exame clínico visual, técnicas de estudo funcional da retina ou lesões cutâneas), não havendo informações sobre os níveis bioquímicos desta vitamina.

Uma das primeiras inferências sobre a concentração sanguínea de vitamina A, em crianças de 1 a 7 anos de idade, no Rio de Janeiro, foram feitas por COSTA (1953a e 1953b), que consideraram deficientes, mesmo na ausência de qualquer manifestação clínica, valores inferiores 16µg/dl.

Alguns anos mais tarde, através de pesquisas realizadas pelo Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense (ICNND, 1965), na Região Nordeste, foram encontrados níveis de vitamina A no sangue abaixo de 10µg/100ml em cerca de 30% das crianças menores de 5 anos e, em 10% das pessoas acima de 6 anos de idade. Neste mesmo estudo foi registrado que 42% das famílias tinham consumo de vitamina A de apenas cerca da metade da ingestão recomendada, concluindo que a ocorrência de hipovitaminose A no Brasil era dos problemas nutricionais mais graves.

Logo depois, entre 1965 e 1966, pesquisas realizadas pelo Instituto de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, encontraram alguns casos com níveis de vitamina A inferiores a 10µg/100ml de soro, sendo que cerca de 15 a 27% da população apresentaram-se com níveis de vitamina A entre 10 a 19µg/100ml. Em pesquisas posteriores, realizadas pelo mesmo Instituto, por volta de 1967, ficou comprovada a ocorrência de níveis de vitamina A abaixo de 10µg/100ml em 2% das crianças de 1-4 anos de idade, e em 0,8% entre 10 a 19 anos. Níveis de 10 a 19µg/100ml foram encontrados em 13,6% das crianças com menos de 9 anos (BATISTA, 1969).

Embora os conhecimentos existentes até essa época não fossem muito avançados, já era bastante indicativo que a hipovitaminose A era um problema grave, em algumas regiões do Brasil. Em 1977, a hipovitaminose A, passou a ser reconhecida como problema de Saúde Pública em várias regiões do país. A partir daí, a dosagem sanguínea de retinol passou a ser utilizada com frequência no diagnóstico da hipovitaminose A.

No Estado de Pernambuco, o trabalho de FLORES & ARAÚJO (1978) sobre o armazenamento de vitamina A no fígado de crianças com menos de 7 anos de idade, falecidas na cidade de Recife, apontaram um "déficit" no armazenamento da vitamina. Os Autores encontraram valores abaixo de 20 µg/g de tecido hepático em 36% das crianças. Em estudo semelhante, OLSON (1979) na Bahia e DOREA *et al.* (1984) em Brasília demonstraram baixas reservas hepáticas, principalmente entre o primeiro e o segundo ano de vida, em crianças brasileiras mortas por diversas causas.

No Estado da Paraíba, através de estudos clínicos, foi encontrada alta prevalência de xeroftalmia, ceratomalácia e manchas de Bitot em vários municípios da região (SANTOS *et al.*, 1983a; ARAÚJO *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 1983b; D'ANS *et al.*, 1988). Ao contrário do que ocorre em diferentes locais da Ásia (SHRIMPTON, 1989), os casos clínicos de xeroftalmia diagnosticados no Nordeste do Brasil ocorreram predominantemente nos dois primeiros anos vida (SIMMONS, 1976; D'ANS *et al.*, 1988).

Na Região Norte, SILVA (1959), avaliando o estado nutricional da população amazônica, concluiu que a deficiência de vitamina A destacava-se como uma das mais frequentes. Através de estudos clínicos e inquéritos alimentares, foram registrados sinais clínicos sugestivos de hipovitaminose A e baixa ingestão de vitamina A.

Em 1963, CONTENTE, estudando a população infantil da cidade de Manaus, também encontrou sinais clínicos atribuíveis à hipovitaminose A. Posteriormente, outros autores encontraram ingestão de vitamina A baixa (cerca de 52 a 70%) e, grande incidência de sinais clínicos (xerose e espessamento conjuntival) indicativos da deficiência de vitamina A na população rural e urbana do estado do Amazonas (GIUGLIANO *et al.*, 1978a; GIUGLIANO *et al.*, 1978b; MARINHO *et al.*, 1981). Mais recentemente, SHRIMPTON (1984), estimando o consumo de nutrientes na dieta de 70% da população de Manaus, verificou que a vitamina A era o nutriente mais limitante.

ARAÚJO *et al.* (1986), estudando pré-escolares e escolares da área urbana e rural, na região do Vale do Jequitinhonha, MG, encontraram alta prevalência de hipovitaminose A. Nas crianças da área urbana foram encontrados índices de deficiência ($< 10\mu\text{g/dl}$), tanto entre os pré-escolares (8,9%) como entre os escolares (4,4%). Já nas crianças da área rural valores abaixo de $10\mu\text{g/dl}$ somente foram encontrados entre os pré-escolares (5,8%), estando presente em 23,6% dos escolares valores entre 10 e $20\mu\text{g/dl}$.

Na Região Sul do Brasil há relatos de surtos de xerofthalmia e cerotomálacia, entre 1963 e 1965, em crianças de Santa Catarina alimentadas com leite desengordurado doado pelo UNICEF (PEREIRA *et al.*, 1966; SANTOS, 1988). Em Lomba do Tarumã (Viamão/RS) WILSON & NERY (1983), encontraram 43,9% de pré-escolares com níveis sanguíneos abaixo de $20\mu\text{g/dl}$ de vitamina A.

Percebe-se que as informações sobre a situação da hipovitaminose A no país ainda são poucas e esparsas, principalmente com relação as dosagens sanguíneas da vitamina. No Estado de São Paulo, a maioria dos trabalhos relacionados com a carência de vitamina A foram feitos na capital. Uma das primeiras observações sobre o problema foi feita por GANDRA (1954), que destacou a frequência do aparecimento de manchas de Bitot em grupos populacionais da capital.

RONCADA (1978c), um dos pesquisadores que mais tem se dedicado ao estudo da hipovitaminose A no Estado de São Paulo, relata que a deficiência de vitamina A merece atenção especial. Através de inquéritos clínicos, bioquímicos e alimentares, RONCADA (1972); RONCADA *et al.* (1978c) e RONCADA *et al.* (1981) verificaram que a deficiência de vitamina A em algumas regiões do Estado de São Paulo constituía problema de Saúde Pública.

RONCADA *et al.*, (1978c) apontam existir hipovitaminose A em nível bioquímico em filhos de migrantes nacionais, em trânsito pela Capital do estado de São Paulo. Os resultados obtidos sobre a dieta foi de um consumo muito baixo de alimentos-fonte de vitamina A pré-formada e de pró-vitamina A, sendo encontrados níveis sanguíneos de retinol abaixo de 10µg/dl em 13,9% das crianças menores de 7 anos de idade. Logo a seguir, RONCADA (1979) encontrou níveis plasmáticos de vitamina A na categoria "deficiente" (< 10µg/dl) e "baixo" (10-20µg/dl) em mais de dois terços dos pré-escolares de um bairro da periferia de São Paulo. Em outra pesquisa bioquímica realizada por WILSON *et al.* (1981), com crianças albergadas em instituição para menores, foram encontrados níveis séricos de vitamina A < 10µg/dl em 39,4% e abaixo de 20µg/dl em 73,9% da população estudada. Paralelamente, MAZZILLI & GANDRA (1981) encontraram acentuada deficiência no consumo de vitamina A em pré-escolares do interior de São Paulo.

Em trabalhos posteriores, RONCADA *et al.* (1984), ainda encontraram alta prevalência (30,2%) de níveis de retinol abaixo de 20 µg/dl nos pré-escolares de 3 a 6 anos de idade de um município da Área Metropolitana de São Paulo.

Apesar do levantamento realizado em vários estados do Brasil sobre xerofthalmia por meio de questionários enviados a oftalmologistas revelarem baixa incidência de lesões oculares (RONCADA *et al.*, 1978a), WILSON *et al.* (1980), WILSON *et al.* (1981) e WILSON & RONCADA (1985) estudando o estado nutricional, em relação a vitamina A, de pré-escolares, chegaram à encontrar prevalência de até 32% de xerose conjuntival, utilizando o corante Rosa Bengala como meio de detecção.

Em Ribeirão Preto (SP), FAVARO *et al.* (1986a) reconheceram a existência de hipovitaminose A em proporções alarmantes. Constataram, os Autores, níveis plasmáticos de retinol abaixo de 10µg/dl e de 20µg/dl, em cerca de 2,0% e 50% das crianças, respectivamente. Apesar de não terem registrado sinais clínicos oculares sugestivos de hipovitaminose A, a deficiência de vitamina A é um problema de Saúde Pública na região, visto que metade das crianças apresentaram níveis inadequados de retinol (10-20 µg/dl).

Pelo exposto, percebe-se que os dados existentes no Brasil, para expressar o dimensionamento da deficiência de vitamina A e sua distribuição geográfica e populacional, ainda devem ser encarados como fragmentários, especialmente

considerando-se que a maioria dos levantamentos foram realizados há mais de seis anos e o estado de saúde e adequação da ingestão de nutrientes da população é função de vários outros fatores que, por sua vez, mudam com o passar dos anos.

As informações referentes à dieta da população apontam níveis de consumo de vitamina A bem abaixo das recomendações dietéticas (IBGE, 1982). Embora não existam dados mais atualizados sobre o consumo de alimentos pelos brasileiros, estudos mais recentes evidenciam ingestão inadequada de vitamina A em algumas localidades do Estado de São Paulo, o que tem sido frequentemente confirmado por inquéritos bioquímicos.

A hipovitaminose A também tem se destacado como um fator importante na determinação da morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Em decorrência, há mais de duas décadas começaram a surgir, em várias partes do mundo, programas de combate à hipovitaminose A. No Brasil, as propostas de implantação destes programas correm o perigo de acontecerem sem que novos estudos sobre a prevalência de hipovitaminose A sejam realizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra

4.1.1. Local e época da pesquisa

O estudo foi conduzido na periferia do Município de Campinas que tem uma população de 846.238 habitantes, no ano de 1991. Nesse mesmo ano, a população favelada compreendia 67.474 pessoas, distribuídas em 14.248 barracos (CAMPINAS, 1993).

O trabalho de campo compreendeu o período de abril de 1991 a fevereiro de 1992. A aplicação de cada questionário e a realização dos exames em cada domicílio duraram cerca de 30 minutos.

4.1.2. Casuística

A pesquisa incluiu 341 crianças, entre 3 e 10 anos de idade, selecionadas de 18 favelas do Município de Campinas, SP.

4.1.3. Critérios de seleção

Só foram incluídas no estudo crianças de 3 a 10 anos de idade. Foram excluídas as crianças menores de 3 anos, em virtude da dificuldade em aplicar o teste de CICO, e as crianças com história de febre ou infecções nos últimos 5 dias anteriores à data de realização da pesquisa; foram excluídas também as crianças com 11 anos completos. Todos os questionários utilizados e o exame de CICO foram previamente testados (Fichas 1, 2, 3 e 4). Somente era incluída a criança que tivesse o consentimento prévio dos pais ou responsáveis, devidamente assinado, autorizando a participação da criança na pesquisa.

4.1.4. Cálculo da amostra

Dois cálculos de tamanhos amostrais foram obtidos, segundo o tipo de estudo a ser desenvolvido. O primeiro cálculo, visando estabelecer o tamanho da amostra, foi feito em função de um estudo piloto, onde foi estimado em 100 crianças avaliadas pela CICO que 2% apresentavam deficiência de vitamina de A ou 98% não apresentavam a característica. Para este cálculo, considerou-se um nível de significância de 5%, e estimou-se uma diferença em 2% entre a proporção amostral e a populacional. O número mínimo de 196 crianças foi obtido através da fórmula: $M = (1,96)^2 pq/d^2$, onde: p=proporção de indivíduos com a característica na população; q=proporção de indivíduos que não tem a característica na população; e d=diferença entre a proporção da população e amostra (ARMITAGE & BERRY, 1987). Levando-se em consideração perdas que ocorrem normalmente em estudos com população, selecionaram-se 350 crianças, das quais conseguiu-se resultados para o estudo de vitamina A pela CICO em 298. O segundo cálculo foi feito para comparar os resultados obtidos com a CICO e as dosagens séricas de retinol. Seguindo-se a metodologia proposta por POCOCK (1983), para estudos clínicos, comparativos, foi estimado o tamanho amostral em 117 crianças, com um nível de significância de 5%, um poder de 90%, considerando uma diferença de 10% a ser detectada entre os testes.

O número de favelas sorteadas foi determinado arbitrariamente, $n = 18$, tomando-se como base a capacidade de operacionalização da pesquisa (tempo e recursos disponíveis).

4.1.5. Processo de amostragem

Segundo planta fornecida pela Prefeitura Municipal de Campinas, a região está dividida em 13 Areas Regionais (AR). Em março de 1991, havia 103 favelas distribuídas por todo o Município, com 99 delas localizadas em 11 AR. As 4 favelas restantes ficam localizadas em duas subprefeituras e dois subdistritos.

Com base no mapa da Cidade, foi feita a distribuição das favelas agrupando-se as 13 AR's de modo que formassem apenas 4 grupos. Para diminuir a variabilidade do estimador, tentou-se fazer uma associação homogênea entre as diversas áreas, levando-se em consideração as particularidades de cada local, como por exemplo, as favelas próximas ou não do CEASA, visando eliminar a influência da maior oferta de alimentos fontes de vitamina A. A divisão em grupos foi distribuída da seguinte forma:

- Grupo 1 (AR 5, 6, 7, 11, 12, 13, duas subprefeituras e dois subdistritos), região mais distante do centro da cidade, separada pela via Anhanguera;
- Grupo 2 (Ar 2 e 3), região mais próxima ao Shopping Center Iguatemi;
- Grupo 3 (AR 4), região mais próxima ao CEASA;
- Grupo 4 (AR9 e 10), região a leste da via Anhanguera.

Na Tabela 1 encontra-se o total de favelas por Área Regional, a divisão em grupos e o número de favelas sorteadas dentro de cada grupo.

TABELA 1 - Distribuição das favelas por área regional, grupos e número de favelas sorteadas. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPOS	ÁREAS REGIONAIS	NÚMERO DE FAVELAS/AR	NÚMERO DE FAVELAS SORTEADAS
1	AR 5	01	11
	AR 6	01	
	AR 7	30	
	AR 11	01	
	AR 12	18	
	AR 13	11	
	Subprefeituras/ Subdistritos	04	
2	AR 2	03	02
	AR 3	08	
3	AR 4	10	02
4	AR 9	07	03
	AR 10	09	
TOTAL DE FAVELAS	103	TOTAL DE SORTEADAS	18

Em seguida, procedeu-se o sorteio das favelas dentro de cada grupo, utilizando-se a tabela de números aleatórios de COCHRAN (1977). A sequência de participação de cada favela foi escolhida aleatoriamente. Na Tabela 2 está a relação das favelas sorteadas, sequência e período de participação na pesquisa.

TABELA 2 - Discriminação das favelas sorteadas por grupo, ordem e período de participação na pesquisa. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPOS	NOME DAS FAVELAS SORTEADAS	ORDEM	PERÍODO DE PARTICIPAÇÃO
1	J. Lago J. C. Eliseos 1ª, 2ª e 3ª parte J. N. América 1ª e 2ª parte J. C. Belo J. Descampado J. Lisa I, II e J. Metanópolis	17ª 7ª, 8ª, 9ª 15ª, 16ª 13ª 14ª 10ª, 11ª, 12ª	dezembro/91 set/out/nov/91 jan/fev/92 janeiro/92 dezembro/91 nov/dez/91
2	J. Guararapes 1ª e 2ª parte	3ª, 4ª	julho/91
3	J. Campineiro 1ª e 2ª parte	1ª, 2ª	abril/jun/91
4	V. Georgina J. Sta. Eudóxia 1ª, 2ª parte	18ª 5ª, 6ª	jan/fev/92 agosto/set/91

Como não se conhecia o número de residências em cada favela determinou-se arbitrariamente que o número de domicílios visitados por favela corresponderia a 10%. O sorteio dos domicílios foi aleatório, sendo que a primeira residência escolhida era feita tomando-se como ponto de partida a casa do representante das favelas, mantendo-se a proporção de 1 para cada 10 domicílios, seguindo-se por toda a extensão da favela. Quando havia recusa da família, ausência de criança ou domicílio fechado, era escolhida a residência seguinte. De cada família amostrada foram estudadas no máximo duas crianças, selecionadas por sorteio.

A distribuição das favelas visitadas encontra-se na Figura 1 e os números de crianças e de famílias amostradas para o estudo encontram-se na Tabela 3.

O estudo foi aprovado pela Secretaria Municipal da Saúde (SMS) com base em convênio de cooperação (Lei Municipal nº 6463, de 08/05/91) entre a SMS e a UNICAMP.

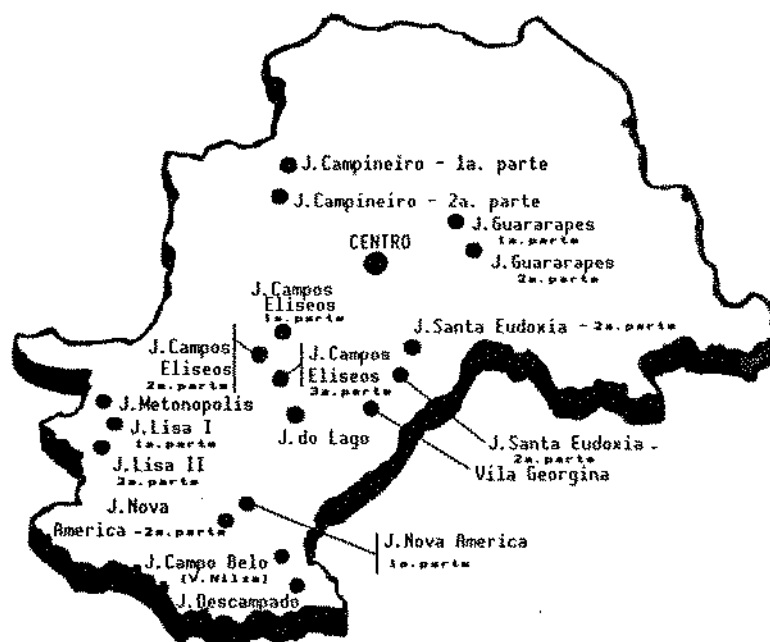


FIGURA 1 - Mapa de distribuição das favelas pesquisadas

TABELA 3 - Distribuição por favelas do número de crianças e de famílias selecionadas para o estudo. Campinas, SP, 1991/1992.

NOME DAS FAVELAS	NÚMERO DE CRIANÇAS	NÚMERO DE FAMÍLIAS
J. Campineiro (1ª e 2ª parte)	41	27
J. Sta. Eudóxia (1ª e 2ª parte)	28	20
J. Campos Eliseos (1ª, 2ª e 3ª parte)	72	51
J. Descampado	18	11
J. Lago	23	14
J. Guararapes (1ª e 2ª parte)	18	11
J. Lisas I, II e J. Metanópolis	37	22
J. N. América (1ª e 2ª parte)	29	15
V. Georgina	72	50
V. Nilza ou J. C. Belo	12	8
TOTAL	350	229

4.1.6. Coleta de dados

Primeiramente era feito um contato com o representante de cada favela para informar aos habitantes os objetivos da pesquisa. Após o consentimento das famílias, localizava-se o Centro de Saúde mais próximo da favela a ser pesquisada, e através de reunião com coordenadores e funcionários tentava-se conseguir seu apoio para a realização da coleta de sangue. Após confirmação destas duas etapas iniciava-se a coleta de dados, que era feita por meio de entrevistas domiciliares (Ficha 1), com informações dadas pelos pais ou responsáveis pelas crianças. Em cada domicílio visitado era feito um esclarecimento às famílias sobre os objetivos e finalidade da pesquisa. Houve a preocupação em fazer retornar à família os resultados dos exames realizados e, sempre que necessário, as crianças doentes eram encaminhadas aos serviços médicos do Centro de Saúde de cada região.

Todas as etapas foram conduzidas pela Autora contando com a participação de colaboradores para ajudar nas tarefas de tomadas de peso, altura e na aplicação do exame de citologia de impressão da conjuntiva ocular.

4.1.7. Características da amostra

Para caracterizar a amostra, investigaram-se as seguintes variáveis: renda familiar, número de pessoas da família, instrução dos pais, tipo de moradia, antropometria, inquérito alimentar, exames hematológicos e protéicos.

A renda familiar foi obtida em salário mínimo da época de realização da pesquisa, e a renda per capita a partir da divisão da renda total pelo número de indivíduos da família. Considerou-se como número de pessoas da família todos aqueles que vivem no mesmo domicílio e se beneficiam da renda familiar.

O grau de instrução dos pais foi assim classificado: analfabeto (com menos de 1 ano de estudo); primário incompleto (1 a 3 anos de estudo); primário completo (4 anos de estudo concluído); e ginásial (5 a 8 anos de estudo).

4.2. Métodos

4.2.1. Antropometria

Foi realizada, em todas as crianças, a tomada de peso e de altura, no próprio domicílio, e quando necessário, na sede da favela. As crianças foram pesadas sem sapatos e de calção ou calcinha, utilizando-se balança de marca Filizola, eletrônica, com capacidade para 150kg. Após cada 10 pesagens a balança era recalibrada com peso de 1kg. A altura foi medida com as crianças descalças e com os pés juntos, de costas para a parede, utilizando-se uma fita métrica de 200cm de extensão, marca Stanley (francesa), cedida pelo INAN, ao Departamento de Medicina Preventiva. As leituras foram realizadas em cm e mm.

A data de nascimento de cada criança foi obtida a partir da certidão de nascimento. A idade e as medidas (peso e altura) foram relacionadas com a população de referência do National Center for Health Statistics-NCHS (OMS, 1983) através de escores de desvio padrão (z score). O cálculo dos escores z foram feitos utilizando-se softwares desenvolvidos pelo Center for Disease Control, em Atlanta, GA, EUA (Anthropometric software package), descrito por JORDAN (1987). Para a divisão dos grupos por grupo etário utilizou-se as recomendações de WATERLOW *et al.* (1977).

4.2.2. Exame oftalmológico

Em todas as crianças foi realizado um exame clínico do globo ocular, sob luz ambiente, à procura de sinais de hipovitaminose A. Numa subamostra (20%), extraída aleatoriamente das crianças submetidas ao exame de sangue, assim como em todas as crianças diagnosticadas anormal pela CICO, ou seja, consideradas com deficiência de vitamina A, foi realizado exame oftalmológico de biomicroscopia externa e de fundo de olho por especialistas da UNICAMP (Dra. Alzira Delgado), para verificar sinais de xerofalmia e conjuntivite. As crianças eram transportadas pela Autora, acompanhadas dos pais ou responsável, até o Centro de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Unicamp e, após a realização dos exames, eram levadas de volta até suas residências.

4.2.3. Inquérito alimentar

Através de entrevista com a mãe ou responsável pela criança, foram colhidas informações sobre o consumo alimentar, através da aplicação de inquérito recordatório de 24 horas, para todas as crianças sorteadas (Ficha 2). O cálculo dos nutrientes para cada criança, foi obtido usando-se o Programa Computadorizado de Cálculo de Dietas desenvolvido pelo Centro de Informática em Saúde, da Escola Paulista de Medicina (ANÇÃO *et al.*, s.d.), que utiliza para o cálculo a Tabela de Composição Química dos Alimentos, U.S., Department Agriculture, Raw, processed, prepared; Agriculture Handbook 8, revised 1963, reprinted 1982.

O valor de vitamina A foi obtido a partir de análises feitas no Brasil: por ALMEIDA & PENTEADO (1987) para cenoura; por RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA (1987) para alface, salsinha, rúcula, agrião, couve, almeirão, chicória; por ARRIMA (1987) e ARRIMA & RODRIGUEZ-AMAYA (1988) para abóbora; por TAVARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1988) para tomate; por GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) para manga; por KIMURA (1989) para mamão; e, por YOKOYAMA (1989) para pimentão e brócolos. Para as adequações de consumo de proteínas e energia foram usadas as recomendações da Food and Agriculture Organization/WHO (FAO/WHO, 1985). As adequações do consumo de ferro e de vitamina A foram analisadas seguindo-se as recomendações da FAO/WHO, de 1988.

A frequência de consumo de alimentos no último mês anterior à entrevista (Ficha 3) foi empregada apenas nas crianças selecionadas para o exame de sangue. No questionário de frequência alimentar os alimentos foram agrupados de acordo com seu nível de vitamina A: baixo < 50 µg; moderado, entre 50 e 250 µg; e alto > 250 µg. A avaliação do questionário foi feita distribuindo-se escores para cada grupo de alimentos. Os alimentos classificados com teor baixo tiveram escore igual a 1, os alimentos com teor moderado o valor do escore foi de 3 e aqueles com teor alto tiveram escore igual a 5, seguindo-se as recomendações do International Vitamin A Consultative Group (IVACG, 1989). O resultado final é dado pela soma dos escores obtidos e posteriormente agrupados em categorias de acordo com o nível de risco nutricional. O risco nutricional é determinado em função do requerimento basal de 200 ER/dia para pré-escolares, recomendado pela FAO/WHO (1988). A classificação dos escores em categorias de risco nutricional está descrita a seguir:

escores > 210 = baixo risco
escores 120-210 = moderado risco
escores < 120 = alto risco

4.2.4. Citologia de impressão da conjuntiva ocular (CICO)

O teste foi realizado em todas as crianças nos dois olhos. Utilizou-se papel filtro de acetato de celulose (Millipore HAWP 304 Fo, type HA, 0,45 μ m), doado pelo grupo de pesquisadores do Dana Center for Preventive Ophthalmology, Baltimore, USA.

O papel filtro foi cortado em pequenas tiras de tamanho aproximado de 20 x 4 mm, guardados em placa de Petri. Em uma de suas extremidades era feito um corte transversal para diferenciar a parte a ser aplicada na conjuntiva do olho.

O procedimento do exame era explicado aos pais e, em seguida à criança. Com a ajuda de um auxiliar, o olho da criança era aberto, tentando-se fazer com que ficasse com o olhar fixado para o lado oposto. Em alguns casos, era necessário a presença da mãe para dar mais segurança e ajudar a distrair a criança e mantê-la com olhar fixo e o olho bem aberto. Neste momento, a ponta mais larga do papel filtro era aplicada delicadamente na conjuntiva temporal de cada olho, colocando-se, levemente, o dedo sobre o papel para facilitar a aderência das células epiteliais. Rapidamente, o papel era removido sob uma leve pressão, e as células coletadas transferidas para uma lâmina, devidamente identificada, por uma simples pressão do dedo sobre o papel. Em seguida, a lâmina era fixada em etanol (95%) por, no mínimo, 15 minutos. Simultaneamente, o papel filtro contendo as células não transferidas para a lâmina era imediatamente colocado em vidros de 5 ml, identificados, contendo a solução fixadora, preparada com 75 ml de álcool etílico (95%), 25 ml de água destilada, 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de formaldeído (37%). O tempo mínimo para a fixação foi de 10 minutos.

Após a realização do exame citológico, o material era transportado ao laboratório para a execução do processo de coloração. As lâminas, após serem secas ao ar, eram coradas em solução de Ziehl-Nielsen por 20 minutos. Esta solução continha 1 volume de fucsina fenicada e 2 volumes de azul de alcian (0,2%) em solução de ácido acético a 5%. No preparo da solução de fucsina fenicada foi adicionado 0,05g do corante em 10ml de etanol (95%), misturando-se, a seguir com 90ml de ácido fênico à 5%. Após o

processo de coloração, as lâminas eram lavadas em água corrente, secas, fixadas com algumas gotas de "Bálsamo do Canadá" e, posteriormente, examinadas ao microscópio óptico.

As tiras de papel filtro de celulose, após a fixação, eram delicadamente transferidas da solução fixadora para placas "well-plate" de 24 orifícios, marca Corning. Em seguida, os papéis foram hidratados com água por 2 minutos, secos e oxidados em ácido periódico (0,5%) por 2 minutos. Posteriormente, foram lavados com reagente de Schiff diluído em água (1:1) por 8 minutos. A cor róseo do papel era reduzida após várias lavagens com água da torneira. Ao remover o excesso de água, os papéis foram colocados em banho com metabissulfito de sódio (0,5%) durante dois minutos, sob leve agitação. Mais um banho de água corrente por 2 minutos, foi necessário e o excesso de água removido para serem corados com solução de hematoxilina de Harris, filtrada. Uma outra lavagem foi necessária, e o excesso de água retirado em banho com álcool (95%) por 2 minutos. Em seguida, os papéis foram desidratados completamente em dois banhos de álcool (100%) durante 2 minutos cada vez. Posteriormente os papéis foram clarificados com xilol por 20 minutos. A montagem do papel nas lâminas foi feita com gotas de "Bálsamo do Canadá" e cobertos com lamínula para serem observados ao microscópio óptico.

Interpretação dos resultados: as impressões foram interpretadas seguindo-se as recomendações do International Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology (ICEPO, 1988), e sugestões de WITTPENN *et al.* (1988), CARLIER *et al.* (1989) e SHARMA & UNDERWOOD (1989). Utilizamos o critério de classificação mais simples considerando-se apenas 2 estágios citológicos previamente padronizados. O critério usado para definir a citologia foi a presença de pelo menos cinco células caliciformes para o normal ou negativo (Foto 1) e menos que cinco, para o anormal ou positivo (Foto 2). As crianças com citologia normal em pelo menos um olho eram consideradas normais. Nos casos em que só foi possível a realização do exame em um olho ou quando havia somente uma amostra com material conjuntival suficiente para a interpretação, os resultados normais tinham sua classificação determinada por uma amostra. Entretanto, a classificação de citologia anormal somente era aplicada nos casos em que os dois olhos acusavam resultados positivos ou quando havia material conjuntival suficiente dos olhos para a interpretação. Em todos os casos considerados anormais a CICO foi repetida para confirmar o diagnóstico.

Todas as amostras foram observadas ao microscópio óptico primeiramente com pequeno aumento (40x) e, em seguida, com o aumento de 100x, fazia-se a classificação em: normal (negativo), quando presentes pelo menos cinco células caliciformes ou abundante mucos; anormal (positivo), quando havia ausência ou menos de cinco células caliciformes; e inconclusivo, quando não havia material suficiente ou a qualidade da coloração não era satisfatória. Também foram observadas alterações morfológicas das células epiteliais, alargadas e separadas com núcleo picnótico. Foi considerado picnótico o núcleo cujo diâmetro era expressivamente menor e, apresentava-se com uma coloração densa e escura em relação aos demais.

As fotografias foram feitas com microscópio óptico Olympus CBA, usando câmera PM-6 (Olympus 35mm).

FOTO 1 - CICO NORMAL, presença de células caliciformes, coloração com Ziehl - Nielsen; aumento 200x.

FOTO 2 - CICO ANORMAL, aspecto típico da deficiência de vitamina A (ausência de células caliciformes), coloração com Ziehl-Nielsen; aumento 400x.

4.2.5. Avaliação bioquímica

a) Coleta de sangue

Foi realizado exame de sangue em uma subamostra aleatória de 138 crianças. A coleta de sangue foi também realizada em todas as crianças com citologia anormal ou positiva. As crianças eram conduzidas pela Autora, acompanhadas de um responsável, até o Centro de Saúde e as amostras de sangue colhidas pela manhã, em jejum, por venopunção, usando-se tubos Vacutainer, contendo etilenodiaminatetracetato dissódico (EDTA), cerca de 3ml para o exame hematológico e, em tubos Vacutainer sem anticoagulante, cerca de 7ml para as dosagens de retinol, proteínas totais e albumina. Enquanto as amostras colhidas em tubo com EDTA eram cuidadosamente misturadas por inversão, as amostras colhidas em tubo sem anticoagulante eram protegidas da luz com papel alumínio. Após a coleta, os tubos foram arrumados em grade, colocados dentro de caixa de isopor contendo gelo, e transportados suspensos por um barbante na parte traseira do veículo para prevenir hemólise. Os tubos destinados ao exame hematológico

eram levados diretamente ao laboratório do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, enquanto os tubos sem anticoagulante eram processados 3 a 4 horas após a coleta, no laboratório do Departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP para obtenção do soro. O soro foi separado por centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos.

b) Armazenamento das amostras

Após separação, o soro foi dividido em duas alíquotas e armazenado em tubo de polipropileno, tipo Eppendorf de 1,5ml, com um mínimo de espaço entre a borda e a tampa. Inicialmente as amostras foram congeladas a -20°C por 6 meses e, posteriormente em gelo seco por mais 5 meses. O que restava de soro de cada amostra era conduzido ao laboratório de bioquímica do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP para as análises de proteínas totais e albumina.

As soluções padrão de retinol e de acetato de retinila foram guardadas a -20°C em tubos de vidro, protegidos da luz com folhas de papel alumínio, e o espaço de ar preenchido com nitrogênio. O tempo de armazenamento das soluções padrão estoque não ultrapassou o período de 3 meses.

c) Preparo e quantificação dos padrões

As soluções-padrão estoque foram preparadas dissolvendo-se 0,5 mg de retinol (Sigma) e 1,9 mg de acetato de retinol (Merck) em metanol. No preparo da solução de trabalho, uma alíquota de cada solução estoque foi diluída em metanol (1:5 para o retinol, e 1:10 para o acetato de retinila). A absorvância de cada solução foi medida em espectrofotômetro UV/VIS (BECKMAN) na faixa de comprimento de onda de 280 a 380 nm, em cubetas de quartzo de 1cm de largura. A concentração de cada solução foi determinada pela leitura da absorvância máxima utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 1850 para o "all trans retinol" e de 1780 para o "all trans acetato de retinila" em metanol, a 325 nm. A solução de trabalho era utilizada por 1 semana e depois descartada. O padrão interno (1,4 µmol/L ou 40µg/dl) foi feito diariamente a partir de diluição da solução de trabalho de acetato de retinila.

4.2.5.1. Determinação do retinol no soro

As amostras destinadas às dosagens de retinol foram devidamente protegidas da ação da luz, calor e oxigênio em todos os passos de manipulação e extração.

O método utilizado para a extração do retinol foi o de BIERI *et al.* (1979), com algumas adaptações (descritas no item 5.3.4.), seguido de determinação quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme recomendações feitas por BIERI *et al.* (1979) e ARROYAVE *et al.*, (1981). A classificação dos níveis sanguíneos de vitamina A foi feita com base no critério recomendado pelo Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense (ICNND, 1963):

< 10µg/dl (<0,35µmol/L)	=	Deficiente
10 - 19,9µg/dl (0,35-0,70µmol/L)	=	Baixo
20 - 49,9µg/dl (0,70-1,74µmol/L)	=	Aceitável
≥ 50µg/dl (≥ 1,74µmol/L)	=	Alto

1) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

a) Reagentes

Todos os solventes foram de marca Lichrosolv (Merck), filtrados a vácuo em membrana tipo GV, porosidade 0,4µm, Millipore, e a seguir degaseificado em ultrassom. A água era destilada e passada por um sistema de purificação "Milli-Q". O padrão de retinol foi fornecido pela Roche Inc. e o de acetato de retinila foi da Sigma Chemical Co.

b) Sistema Cromatográfico

Foi utilizado equipamento marca LDC/Milton Roy Company, com injetor tipo "rheodyne" e uma alça de amostragem de 10µl de capacidade. Utilizou-se um Espectromonitor II modelo 1202 operando na região ultra-violeta a 325 nm, acoplado a um registrador modelo 3401/3402, com sensibilidade de 0.02 AUFS (Absorbance Units Full Scale). A separação cromatográfica foi feita em coluna de 150 x 4.6 i.d.mm C₁₈(5µm), marca Lichrospher 100 (Merck), protegida por uma coluna de guarda C₁₈ (10µm) Merck. Operou-se sempre de modo isocrático utilizando-se metanol:água (95:5) como fase móvel, filtrada e degaseificada em banho ultra-sônico. O fluxo da fase móvel foi de 1.0 ml/min., gerando uma pressão de 1230 a 1500 psi.

c) Curva padrão de retinol

A curva padrão foi preparada adicionando-se 5 diferentes concentrações de retinol (0,52; 1,05; 1,57; 2,10; 2,62 $\mu\text{mol/L}$) ao "pool" de soro. Logo depois, procedeu-se à extração do mesmo, em duplicata, com adição de quantidade constante do padrão interno (1,4 $\mu\text{mol/L}$).

Para efeito de comparação, foram construídas outras curvas: uma pela adição do padrão ao solvente e outra pela adição do padrão ao "pool" de soro sem vitamina A. A curva feita em solvente foi elaborada por misturar concentrações conhecidas da solução de retinol (0,38; 0,77; 1,15; 1,54; 1,92 $\mu\text{mol/L}$) a uma quantidade fixa do padrão interno (1,4 $\mu\text{mol/L}$) e a mistura injetada. O "pool" de soro sem vitamina A foi obtido após exposição a radiação ultra-violeta por 5 horas e a construção da curva foi semelhante ao da curva padrão.

d) Extração do retinol do soro

Após o descongelamento de cada amostra, pipetou-se 200 μl , em duplicata, para tubos cônicos de vidro. A cada amostra de soro foram adicionados 200 μl de metanol contendo cerca de 1,4 $\mu\text{mol/L}$ do padrão interno (acetato de retinila) para desproteinização. O tubo foi fechado e agitado em misturador Vortex por 10 segundos. Para extrair a vitamina, adicionou-se 240 μl de hexano Merck, agitou-se em misturador Vortex por 45 segundos, e centrifugou-se sob refrigeração (10°C) a 3000 rpm por 5 minutos.

Após separação das fases, transferiu-se cuidadosamente 150 μl da camada hexânica para outro vidro cônico. O solvente foi evaporado a 45°C em banho-maria, sob jato de nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em 100 μl de metanol, agitando-se levemente. A cada extração das amostras uma análise do "pool" de soro armazenado nas mesmas condições era realizada como testemunha. Um esquema resumido das sequências das etapas é descrito a seguir:

Soro (200 μ l)
adicionar 200 μ l de metanol
(a 1,4 μ mol/L acetato de retinila)
agitar por 10 segundos
↓
adicionar 240 μ l hexano
agitar por 45 segundos
↓
centrifugar (10°C), 3000 rpm 5 min.
coletar 150 μ l da fase superior
evaporar em banho-maria (45°C)
sob nitrogênio
↓
redissolver em 100 μ l de metanol
agitar levemente
injetar (obteve-se concentrações 2x)

Fluxograma para determinação de retinol no soro

e) Identificação do pico de retinol

Para a identificação do pico de retinol no sistema cromatográfico uma solução contendo retinol (padrão) e acetato de retinila (padrão interno) foi injetada e verificado os tempos de retenção. Em seguida, uma alíquota do extrato de soro com padrão interno foi injetada e comparados os tempos de retenção, entre o extrato de soro e do padrão.

Para confirmação, adicionou-se padrão de retinol ao "pool" de soro, e verificou-se a co-cromatografia do retinol do soro com o padrão pelo aumento da altura do pico.

f) Testes de recuperação

A eficiência da extração foi estimada pela adição de quantidades conhecidas da solução padrão de retinol (0,52; 1,05; 1,57; 1,75; 2,10 μ mol/L) ao "pool" de

um lote de soro sem vitamina A. Este último obtido pela exposição do soro a lâmpada ultra-violeta por cerca de 5 horas. O processo de extração foi seguido conforme já descrito e o cálculo da recuperação obtido como a porcentagem da concentração adicionada.

g) Precisão e reprodutibilidade

A precisão do método para o mesmo dia foi determinada pela injeção de 10 extratos de um mesmo "pool" de soro. A precisão para diferentes dias foi obtida pela extração, em duplicatas, do "pool" de soro armazenado nas mesmas condições da amostra. A reprodutibilidade do aparelho foi verificada injetando 10 vezes cada uma de cinco concentrações diferentes da solução padrão contendo cerca de $1,4\mu\text{mol/L}$ do padrão interno (acetato de retinila).

4.2.5.2. Exame hematológico

As determinações dos valores do hematócrito, hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM) foram realizadas em contador automatizado COUNTER modelo T 890. O estado de anemia foi diagnosticado quando: os valores de hemoglobina foram menores que 11 g/dl para crianças entre 3 e 6 anos de idade ou quando os valores foram abaixo de 12 g/dl para crianças entre 6 e 11 anos (WHO, 1989); hematócrito abaixo de 32% para os menores de 5 anos ou hematócrito abaixo de 33% para as crianças entre 5 e 11 anos de idade; VCM inferior a $72\mu\text{m}^3$ para os menores de 5 ou VCM abaixo de $75\mu\text{m}^3$ para crianças entre 5 e 11 anos (DALLMAN, 1987). O estado de anemia grave foi dado quando a concentração de hemoglobina atingiu valores inferiores a 9,5 g/dl (MONTEIRO, 1988).

4.2.5.3. Proteínas totais e albumina

A dosagem da proteína sérica foi realizada pelo método de biureto usando-se "kits" Merckotest. Os valores normais variam de 4,0 a 8,0 g/dl, sendo considerado hipoproteicos os casos que apresentaram valores abaixo de 4,0 g/dl. A concentração de albumina foi determinada usando-se o verde de bromocresol como indicador. Os valores normais para albumina são de 3,8 a 5,5 g/dl, considerando-se hipoalbuminêmicos os casos com valores abaixo de 3,3 g/dl (HENRY, 1988).

4.2.6. Suplementação terapêutica

As crianças com hipovitaminose A diagnosticadas pela CICO receberam cápsulas de acetato de retinila (200.000 UI mais 40 UI de vitamina E), doadas pelo Instituto de Alimentação e Nutrição (INAN), sendo reexaminadas 30 dias depois.

4.2.7. Processamento e análise estatística dos dados

Durante o decorrer da pesquisa todas as fichas eram periodicamente revisadas visando corrigir erros e detectar as omissões, e poder retornar às famílias para completar as informações.

As informações foram transferidas para um banco de dados Epi Info versão 5.01 b. Uma listagem contendo todos os dados do arquivo foi confrontada com os questionários para corrigir erros de digitação.

Ao arquivo definitivo, aplicou-se um programa para detectar erros. Os erros foram corrigidos e novamente o programa foi aplicado, sendo o procedimento repetido exaustivamente.

4.2.7.1. Análise estatística

Inicialmente foram construídas tabelas descritivas das variáveis em estudo. O teste t de Student foi utilizado para comparação de médias de dois grupos no caso de variáveis quantitativas (ARMITAGE & BERRY, 1987) e o teste Qui-quadrado para a avaliação das tabelas de contingência.

Posteriormente foi calculada a sensibilidade e especificidade entre os níveis séricos de retinol por CLAE e o número de células caliciformes pela CICO. A concordância entre os dois métodos foi avaliada pelo teste de McNemar (SIEGEL, 1975). Diferentes pontos de cortes foram avaliados segundo a CICO, com suas respectivas sensibilidade, especificidade e intervalos de confiança à 95%.

Uma análise por regressão simples foi realizada para determinar a correlação entre os resultados da CICO com os níveis de retinol no soro (ARMITAGE & BERRY, 1987).

Para o desenvolvimento das metodologias estatísticas acima descritas foi utilizado o pacote estatístico "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS/PC+) e para a construção dos gráficos o software "Haward Graphics".

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Aspectos amostrais

Foram entrevistadas 220 famílias sendo a maior parte das informações (93,4%) fornecidas pela mãe, o restante pelo pai, avô ou avó da criança. O número mínimo amostral (n=196) foi determinado a partir da pesquisa piloto, sendo entretanto selecionados 229 domicílios para um total de 350 crianças.

Das 350 crianças selecionadas obteve-se informações para 341. Nove crianças (2,6%) foram excluídas devido à recusa da família em participar da pesquisa ou por recusa da criança (1,0%), que não aceitou ser avaliada até mesmo na tarefa de pesar e medir.

5.2. Características da amostra

Para melhor caracterizar a amostra, a investigação foi complementada com alguns parâmetros sócio-econômicos, e outras características nutricionais, além do estado de vitamina A das crianças.

5.2.1. Sexo e idade

As características da amostra relacionadas ao sexo e a idade encontram-se na Tabela 4. Das 341 crianças estudadas 175 (51,3%) eram do sexo feminino e 166 (48,7%) do sexo masculino. A média de idade das crianças, que variou de 3 a 10 anos, foi de 6,53 $\pm$ 2,28 anos.

TABELA 4 - Distribuição das crianças, por grupo etário e sexo. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPO ETÁRIO (Anos)	FEMININO		MASCULINO		SUBTOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
3-6	73	(21,4)	81	(23,8)	154	(45,2)
6-10	81	(23,8)	72	(21,1)	153	(44,9)
10-11	21	(6,2)	13	(3,8)	34	(10,0)
TOTAL	175	(51,4)	166	(48,7)	341	(100,0)

5.2.2. Renda per capita

As informações sobre a renda não foram conseguidas para 2,9% das famílias porque não sabiam ou negavam.

Numa pesquisa sobre condições de saúde e nutrição das crianças de São Paulo, MONTEIRO (1988) refere ter encontrado 67,2% das crianças com renda familiar per capita inferior a um salário mínimo. Nesta pesquisa, encontrou-se poucas crianças (12,1%) pertencentes às famílias com renda inferior a um salário mínimo per capita, uma maior proporção (20,5%) entre um e dois salários mínimos per capita, e uma grande porcentagem (49,3%) na faixa entre dois e cinco salários mínimos per capita (Tabela 5). Embora as crianças possam parecer participes de uma situação privilegiada, as mesmas não apresentavam boas condições de vida.

TABELA 5 - Distribuição das crianças segundo a renda familiar per capita. Campinas, SP, 1991/1992.

RENDA FAMILIAR PER CAPITA (Salário mínimo)	N	%
0,00 — 1,00	40	12,1
1,00 — 2,00	68	20,5
2,00 — 3,00	83	25,1
3,00 — 5,00	80	24,2
≥ 5,00	60	18,1
TOTAL	331	100,0

O fato de termos encontrado quase 50% das crianças pertencentes às famílias faveladas com renda per capita entre dois e cinco salários mínimos, e ainda uma grande proporção (18,1%) com renda per capita igual ou superior a cinco salários mínimos, é explicado em parte pela falta de habitação e o alto preço dos aluguéis no Município de Campinas, fazendo com que a classe média se desloque para a periferia da cidade. Em adição, não podemos deixar de citar que investigar a renda é uma tarefa difícil e delicada e, apesar de todo o cuidado exercido na obtenção dos dados, existe a possibilidade de informações falsas terem sido fornecidas.

5.2.3. Instrução dos pais

A Tabela 6 contém as informações sobre a instrução do pai e da mãe. Verifica-se que a maioria das crianças (84,5%) pertencem a famílias cujo pai não teve nenhuma instrução ou cursou apenas os primeiros anos do ciclo primário. O primário completo foi registrado em apenas 4,1% dos pais. As informações foram obtidas para o pai da criança em cerca de 90,9% dos casos, em 9,1% não se conseguiu obter as informações porque a família não tinha convívio com o pai ou desconhecia a informação. A mesma Tabela contém a distribuição do grau de instrução da mãe onde a situação é mais agravante, com quase 91% das crianças com mães sem nenhuma instrução ou tendo completado apenas os primeiros anos do curso primário. Por outro lado, o número de mães na categoria primária completa foi quase o dobro daquele observado para os pais, sendo de 6,8% o número de crianças com mães que concluíram o curso primário contra 4,1% de pais. Na categoria ginásial a instrução da mãe não diferiu da instrução do pai.

TABELA 6 - Grau de instrução do pai e da mãe das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.

GRAU DE INSTRUÇÃO (Anos de estudo)	PAI		MÃE	
	N	%	N	%
Analfabeto (<1)	45	20,4	51	23,2
Primário incompleto (1-3)	141	64,1	149	67,7
Primário completo (4)	9	4,1	15	6,8
Ginásial (5-8)	20	9,1	5	2,3

5.2.4. Tamanho da família

Em relação ao tamanho da família foram registrados médias de $5,8 \pm 2,2$ pessoas por domicílio estudado, sendo $3,4 \pm 1,6$ a média do número de filhos por famílias.

4.2.5. Tipo de habitação

O tipo de construção foi o único aspecto de moradia avaliado. Cerca de 64,8% das crianças vivem em casas de madeira, 19,3% em construção de tijolos não revestidos e 15,9% em habitações de alvenaria com revestimento. É interessante acrescentar que a maioria das condições de habitações eram inadequadas, e as casas de madeira eram de construções precárias, com pouquíssimos quartos e densamente habitadas. Era comum não haver instalações sanitárias com água corrente ou tratada, o que demonstra a falta de saneamento para atender a população pesquisada.

5.2.6. Avaliação antropométrica

Os dados antropométricos foram analisados globalmente, de forma a evidenciar tendências da população-objeto em relação à curva de referência do NCHS (OMS, 1983), recomendada para todos os países como referência e padrão. As Figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, a distribuição dos indicadores antropométricos altura/idade ($n=341$) e peso/altura ($n=320$) das crianças examinadas. A rejeição espontânea registrada foi de 1%.

Na distribuição do índice altura para idade, nota-se um desvio da curva para a esquerda da distribuição referência, com cerca de 33,2% das crianças abaixo de -1 desvio padrão, demonstrando déficits alimentares críticos na fase de crescimento, não chegando a atingir o potencial genético (Figura 2 e Tabela 7).

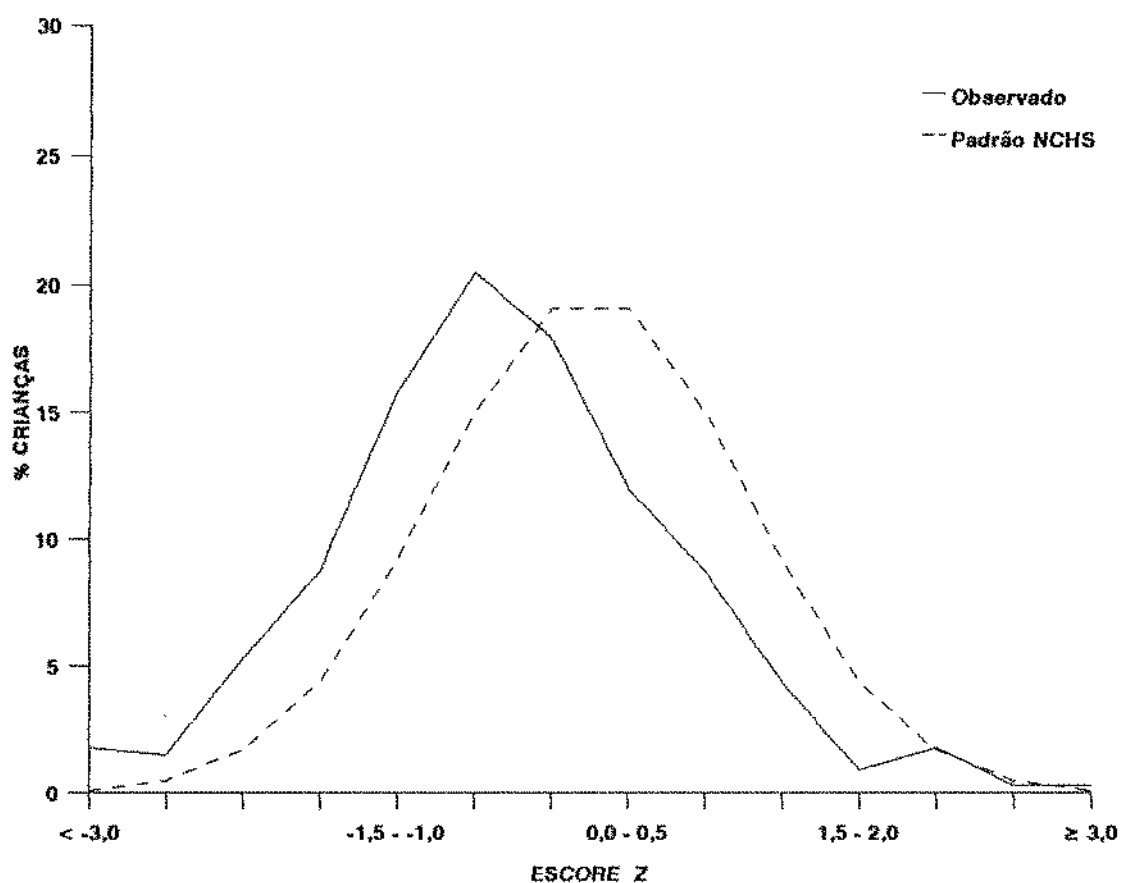


FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO (%) DO ÍNDICE ALTURA/IDADE DE 341 CRIANÇAS, DE AMBOS OS SEXOS, TENDO COMO REFERÊNCIA O NCHS. CAMPINAS, SP , 1991/1992.

TABELA 7 - Distribuição (%) das crianças estudadas referentes aos indicadores altura/idade e peso/altura, em relação a distribuição referência NCHS. Campinas, SP, 1991/1992.

ESCORES Z	ALTURA/IDADE		PESO/ALTURA	
	N	%	N	%
<-2	29	8,5	5	1,6
-2 a -1	83	24,3	44	13,7
-1 a 0	131	38,4	144	45,0
0 a 1	72	21,1	95	30,0
1 a 2	18	5,3	28	8,8
>2	8	2,3	4	1,2
TOTAL	341	100,0	320	100,0

Convém lembrar que reduções expressivas de altura aparecem somente após longos períodos de desnutrição. A altura é um parâmetro mais estável do que o peso, já que não se modifica rapidamente, nem sofre reversão. O ganho em altura ocorre progressivamente e, portanto qualquer atraso no crescimento linear torna-se mais permanente do que o peso (SEOANE & LATHAN, 1971).

Por outro lado, observando-se a distribuição das crianças quanto ao índice peso para altura percebe-se um leve desvio para a esquerda da referência, indicando efeito pequeno dos processo agudos de desnutrição na manutenção peso. A distribuição das crianças para este indicador é de 15,3% abaixo de -1 desvio padrão (Figura 3 e Tabela 7). Considerando que MARTORELL, citado por HORWITZ (1989), sugere que o parâmetro peso-estatura é o melhor preditor de risco de saúde a curto prazo, poderia-se concluir que não existiu fator ambiental que deslocasse a curva da população pesquisada, de forma acentuada em relação a referência NCHS.

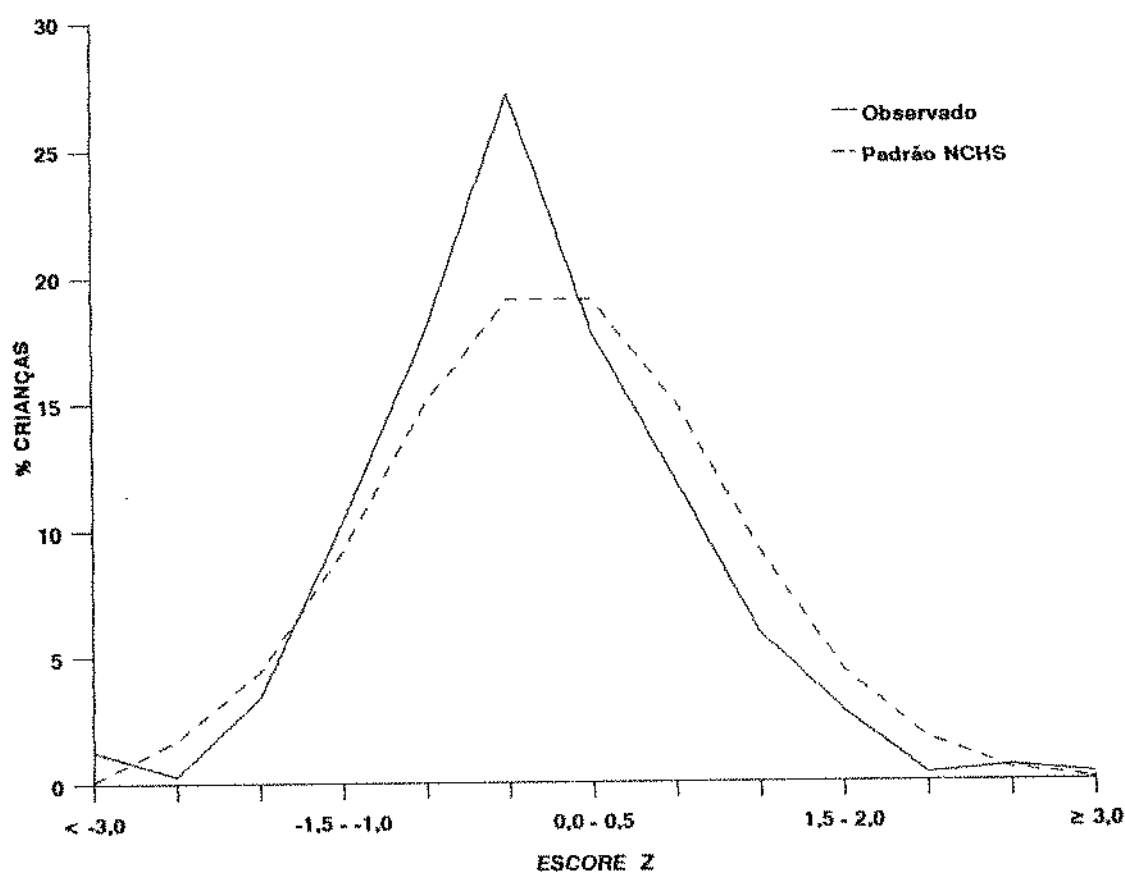


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO (%) DO ÍNDICE PESO/ALTURA DE 320 CRIANÇAS, DE AMBOS OS SEXOS, TENDO COMO REFERÊNCIA O NCHS. CAMPINAS, SP , 1991/1992.

Alguns autores têm mostrado um predomínio de desnutrição crônica no Brasil, refletindo as precárias condições ambientais e sociais da população infantil (MONTEIRO, 1988; MONTEIRO et al., 1989; INAN, 1990). Em Campinas, SP, BARROS et al. (1990) demonstraram "déficit" no crescimento em 32% das crianças de famílias de menor poder econômico matriculadas na 1ª série de escolas públicas, sendo que 11,6% das crianças de classe econômica mais elevada estavam obesas.

Os resultados aqui apresentados apontam a existência de baixos índices de crescimento entre os pré-escolares e escolares da periferia de Campinas.

5.2.7. Inquérito dietético

Para estudar o consumo alimentar das crianças utilizou-se uma avaliação quantitativa da dieta (recordatório de 24 horas). Foi possível obter informações sobre o consumo alimentar para 336 crianças, havendo rejeição de 1% das famílias.

O consumo médio diário de energia e nutrientes, segundo a idade das crianças encontra-se na Tabela 8. Análise dos dados mostra que o consumo de energia e proteínas aumentou com a idade. O consumo de ferro e vitamina A alcançou valores maiores entre os 6 e 10 anos. O menor consumo de vitamina A ocorreu na idade entre 10 e 11 anos e, o menor consumo de ferro entre 3 e 6 anos.

TABELA 8 - Média e desvio padrão do consumo diário de energia, proteínas, ferro e vitamina A entre crianças de 3 a 10 anos. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPO ETÁRIO (Anos)	N	ENERGIA (Kcal) x ± DP	PROTEÍNA (g) x ± DP	FERRO (mg) x ± DP	VITAMINA A (ER) x ± DP
3 — 6	149	1.471±441	40,4 ± 22,2	7,0± 4,1	266±201
6 — 10	153	1.621±460	44,1± 17,7	9,6± 4,9	296± 467
10 — 11	34	1.679±489	45,5± 18,6	8,7± 3,7	242± 282

Para a análise da adequação das dietas (Tabela 9), relacionou-se os requerimentos nutricionais da FAO/WHO (1985 e 1988) com as quantidades fornecidas pela ingestão alimentar das crianças.

O valor nutricional das dietas mostra que o maior percentual de adequação foi para proteínas. Todas as faixas de idade apresentaram adequação superior a 100%, sugerindo consumo satisfatório de proteínas.

Com relação à energia, a adequação média alcançou 93,9% na faixa etária de 3 a 6 anos, tornando-se progressivamente menor nos demais grupos de idade. Os níveis do consumo de ferro e de vitamina A foram os mais baixos, sendo especialmente reduzidos entre os 10 e 11 anos.

Os dados sobre adequação revelam ainda um "déficit" calórico, enquanto que as adequações protéicas foram satisfatórias, confirmando o encontrado por outros autores (RIVERA & RIVERA, 1986; MONTEIRO, 1988).

Os nutrientes cujas deficiências foram mais pronunciadas foram o ferro e a vitamina A, confirmando, por sua vez, o encontrado pelo IBGE (1982) e MONTEIRO (1988).

MOURA (1984), avaliando a dieta de crianças de creches particulares de Campinas também encontrou deficiência de ferro, vitamina A e calorias, contra um excesso de proteínas.

O inquérito dietético apesar de ser uma metodologia simples, permite inferir sobre o estado de nutrição dos indivíduos. Imprecisão nas avaliações de consumo alimentar ocorrem de modo geral (MONTEIRO, 1988), não sendo portanto características exclusivas do método utilizado nesta pesquisa. Os resultados alcançados através do recordatório de 24 horas permitiram descrever o perfil alimentar das crianças residentes nas favelas estudadas.

TABELA 9 - Porcentagem de adequação de consumo de energia, proteínas, vitamina A e ferro das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPO ETÁRIO (Anos)	N	ENERGIA (Kcal)	PROTEÍNA (g)	FERRO (mg)	VITAMINA A (ER)
3-6	149	93,91	166,04	48,66	67,69
6-10	153	87,69	134,97	41,39	78,24
10-11	34	81,68	100,88	36,38	52,47

5.2.8. Parâmetros hematológicos e protéicos

As dosagens de hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VCM) foram realizadas em 138 crianças. A porcentagem dos valores considerados baixos para hemoglobina, segundo a idade, encontram-se na Tabela 10. A presença de anemia, considerada para níveis de hemoglobina abaixo de 11g/dl para a idade entre 3 e 6 anos, foi detectada em 5,0% das crianças; níveis de hemoglobina inferiores a 12 g/dl foram encontrados em 18,2% das crianças com mais de 6 anos. Casos de anemia grave, diagnosticados para hemoglobina abaixo de 9,5g/dl, foram detectados em 1,4% da amostra. Das 32 crianças (23,2%) com níveis de hemoglobina baixos, 3% tinham hematócrito baixo e 1,5% tinham VCM baixo.

Considerando-se os parâmetros do hematócrito, foi encontrado que 3,7% das crianças estavam com valores baixos, sendo que 1,5% das crianças entre 3 e 5 anos tinha hematócrito inferior a 32% e 2,2% para as crianças entre 5 e 11 anos tinham hematócrito inferior a 33%. Quanto ao VCM, valores abaixo de $72\mu\text{m}^3$ foram encontrados em 2,9% das crianças entre 3 e 5 anos e valores abaixo de $75\mu\text{m}^3$ em 3,6% das crianças entre 5 e 11 anos.

Ainda na Tabela 10, observando-se a distribuição da prevalência da anemia com relação às diferentes faixas de idade, evidencia-se a incidência de valores mais baixos de hemoglobina entre os 6 e 11 anos. MONTEIRO (1988), estudando diferentes aspectos da anemia em 912 crianças do Município de São Paulo, comenta ser a idade da criança um elemento crucial na determinação do risco de ocorrência da deficiência, apontando os maiores riscos de anemia na faixa etária de 6 a 24 meses. O mesmo Autor afirma que a partir da idade de 2 anos há uma diminuição da vulnerabilidade infantil ao estado anêmico.

Embora múltiplos fatores possam determinar o aparecimento da anemia, a falta de ferro na infância constitui-se um dos problemas mais graves. Valores de VCM abaixo do normal sugerem um diagnóstico de anemia por deficiência de ferro. Encontrou-se nesta pesquisa baixos valores de VCM em 6,5%, e um aporte dietético de ferro muito aquém das recomendações, principalmente nas crianças de 10 a 11 anos de idade, o que reforça a hipótese nestes casos de anemia por deficiência de ferro.

Com relação às dosagens de proteínas e de albumina, a porcentagem de deficientes foi muito pequena já que somente 5,3% ($n=7$) das crianças apresentaram níveis de albumina sérica menor do que 3,3g/dl e nenhuma delas apresentou hipoproteinemia ($< 4\text{g/dl}$).

TABELA 10 - Distribuição dos valores de hemoglobina segundo a idade das crianças estudadas. Campinas, SP, 1991/1992.

HEMOGLOBINA (g/dl)	IDADE (Anos)			
	3 — 6		6 — 11	
	N	%	N	%
< 9,5	1	0,7	1	0,7
9,5 a 11	6	4,3	5	3,6
11 a 12	24	17,4	19	13,9
≥ 12	25	18,1	57	41,3

5.3. Padronização do método cromatográfico

A técnica da CLAE foi considerada particularmente desejável por várias razões. As vantagens da CLAE sobre os métodos tradicionais incluem rapidez, sensibilidade, identificação simultânea de mais de um componente e eliminação de interferentes. Além disso, por ter alta sensibilidade, a CLAE requer pequenas quantidades de amostra, o que é recomendável quando se trabalha com crianças. Atualmente, a CLAE vem ocupando um lugar de destaque entre os laboratórios mais modernos, sendo entretanto o alto custo do equipamento a principal restrição a seu uso no Brasil.

Para a determinação quantitativa dos níveis de retinol no soro utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência sugerido por BIERI *et al.* (1979) e o recomendado por ARROYAVE *et al.*, (1981).

Antes do início das dosagens de retinol nas amostras coletadas, a metodologia foi exaustivamente testada e padronizada.

5.3.1. Identificação do pico de retinol

O tempo de uma corrida para retinol mais acetato de retinila foi aproximadamente 7 minutos, sendo que o retinol eluiu logo após o solvente (3 minutos) e o acetato de retinila (padrão interno) aproximadamente em 6,7 minutos. Os picos de cada composto foram portanto, muito bem definidos e eluíram sem interferentes (Figura 4).

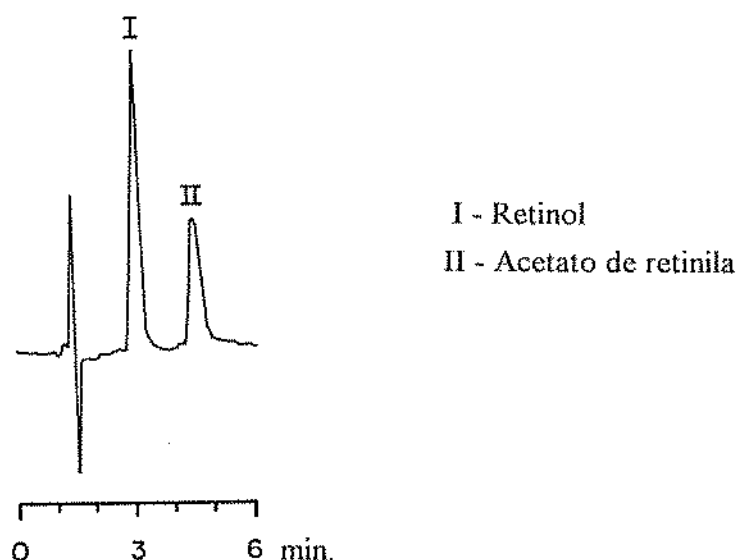


FIGURA-4 - Cromatograma típico do retinol e do acetato de retinila.

Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (95:5) com fluxo 1,0ml/min; pressão 1230-1500 psi; sensibilidade do detector 0,02 AUFS, coluna 150 x 4,6 i.d.mm C₁₈ (5µm), Lichrospher 100 (Merck); comprimento de onda de 325 nm.

A identificação dos picos do extrato de soro foi feita através dos tempos de retenção, idênticos ao do padrão, e da co-cromatografia (Figura 5).

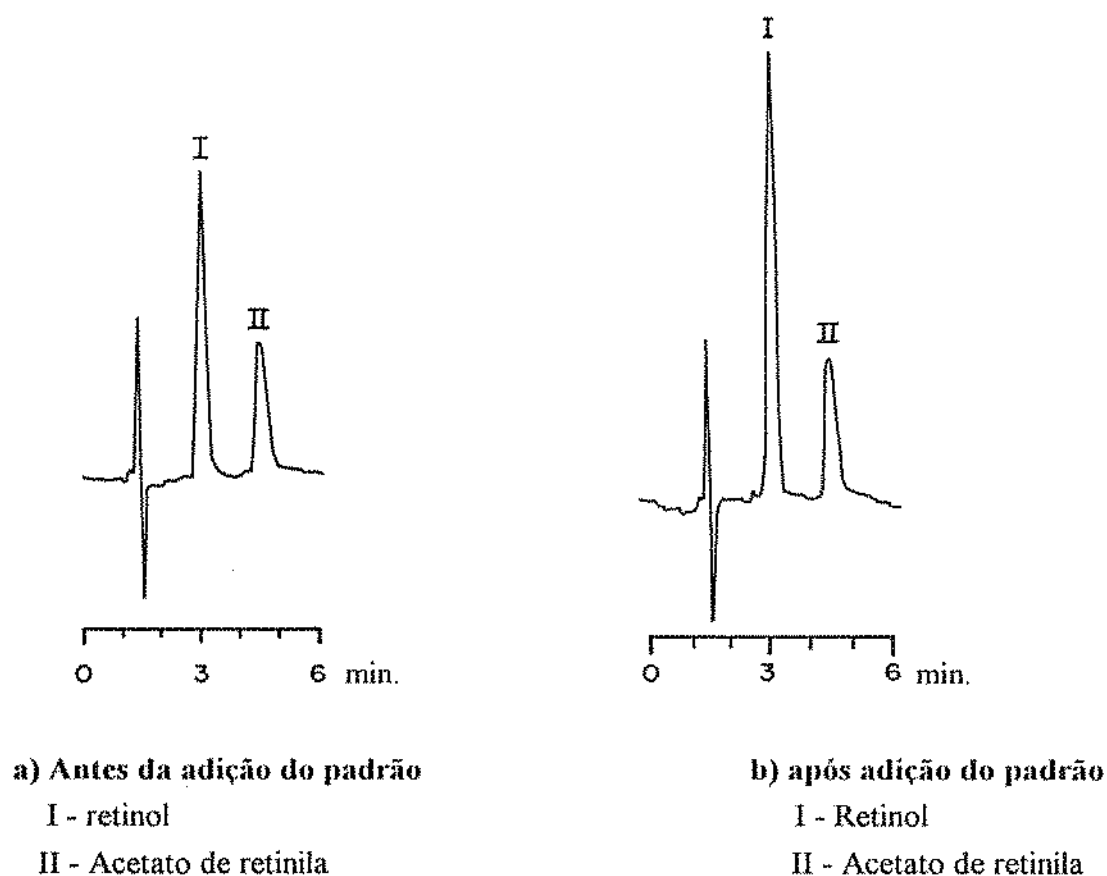


FIGURA 5 - Co-cromatografia do retinol em "pool" de soro antes (a) e após (b) a adição do padrão (retinol). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (95:5) com fluxo de 1,0ml/min; pressão 1230-1500psi; sensibilidade do detector 0,02 AUFS; coluna 150 x 4,6 i.d.mm C18 (5µm), Merck Lichrospher 100 (Merck); comprimento de onda de 325 nm.

5.3.2. Construção das curvas

A questão da construção da curva padrão quando se trabalha com fluidos biológicos que naturalmente contém o padrão a ser adicionado é problemático.

Vários procedimentos são citados na literatura para a escolha da matriz mais adequada para a construção da curva padrão. Alguns autores descrevem curvas construídas pela adição do padrão em água (RUYTER & DeLEENHEER, 1976; NIERENBERG, 1984; NIERENBERG & LESTER, 1986), outros por sua vez, recomendam a construção em solvente (BIERI *et al.*, 1979; DRISKELL *et al.*, 1982). Há ainda os que preferem construir a curva-padrão em solução de soro albumina (MILLER & YANG, 1985), e os que acreditam ser o "pool" de soro com ou sem vitamina A a melhor matriz (BESNER & LECLAIRE, 1980; MILLER *et al.*, 1984; WILLIAMS., 1985; YANG & MAO-JUNG, 1987; KRAFT *et al.*, 1988).

Segundo as recomendações de ARROYAVE *et al.* (1981) a construção de curva-padrão deve ser feita em "pool" de soro após sua exposição à lâmpada ultra-violeta ou proveniente de animais com deficiência de vitamina A, como o procedimento mais acurado.

YANG & MAO-JUNG (1987) empregaram plasma e solvente na construção de curva-padrão e encontraram resultados comparáveis usando solvente ou plasma como matriz.

HUSELTON *et al.* citado por WYSS (1990) numa minuciosa revisão, criticam o uso de soro exposto a radiação ultra-violeta como matriz para construção de curva-padrão. Recomendam, tais Autores, o uso de tampão fosfato nestes casos. Por outro lado WYSS (1990) defende o emprego de curva padrão feita em soro normal por ser mais adequado quando se trabalha com soro, enfatizando a importância do trabalho ser conduzido em matrizes semelhantes.

Percebe-se que a questão, embora polêmica, ainda é pouco discutida. A maioria dos autores apenas citam o tipo de curva que utilizaram para trabalhar sem explicar ou discutir a escolha. Em função disso, resolvemos construir três curvas para efeito de comparação e escolher a que fosse mais reprodutível, e que melhor se adequasse às nossas condições de trabalho. Uma das curvas foi feita em solvente, outra em "pool" de soro normal e outra em "pool" de soro sem vitamina A.

Os resultados de todas as curvas foram calculados pela relação de altura entre o pico do retinol e o pico do padrão interno x concentração ($\mu\text{mol/L}$), segundo recomendações de NOVAK (1988). As curvas foram lineares nas concentrações testadas e os resultados da análise de regressão encontram-se na Tabela 11. Analisando-se esta Tabela, percebe-se que a curva feita em solvente e a curva construída em matriz de "pool" de soro normal apresentaram um coeficiente de correlação para o retinol igual 1,00. Com relação a curva feita em "pool" de soro sem vitamina A o coeficiente de correlação para o retinol foi ligeiramente inferior (0,99).

TABELA 11 - Resultados da análise de regressão linear para as curvas construídas em solvente e "pool" de soro com e sem vitamina A.

ANÁLISE REGRESSÃO	CURVA SOLVENTE	CURVA SORO NORMAL	CURVA EM SORO SEM VITAMINA A
r	1,00	1,00	0,99
r ²	1,00	1,00	0,98
y	-0,1032	-0,0457	0,0218
intervalo de confiança	1,1162 a 1,2976	0,8967 a 1,0271	0,7328 a 0,9762

A comparação dos modelos de regressão linear obtidos para as três curvas encontram-se na Tabela 12. Verifica-se uma diferença estatisticamente significativa do modelo obtido pela construção da reta em solvente comparando-se aos modelos matemáticos das retas construídas em matriz de "pool" de soro com ou sem vitamina A. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as equações de reta construídas em soro normal e soro sem vitamina A. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as equações de reta construídas em soro normal e soro sem vitamina A.

TABELA 12 - Comparação dos modelos de regressão linear obtidos para cada curva.

MATRIZ	MODELOS
"Pool" de soro normal	$y = -0,0457288 + 0,9619013x$ (1)
"Pool" de soro sem vitamina	$y = 0,0218409 + 0,85645144x$ (2)
Solvente (metanol)	$y = -0,1031762 + 1,2069064x$ (3)

Comparações: 1/2 diferença não significativa

1/3 $p < 0,05$

2/3 $p < 0,05$

Para a quantificação dos níveis de retinol nas amostras de soro das crianças deste trabalho, utilizou-se a equação de regressão linear $y = -0,0457 + 0,9619x$ obtida pela construção da reta em "pool" de soro normal (Figura 6).

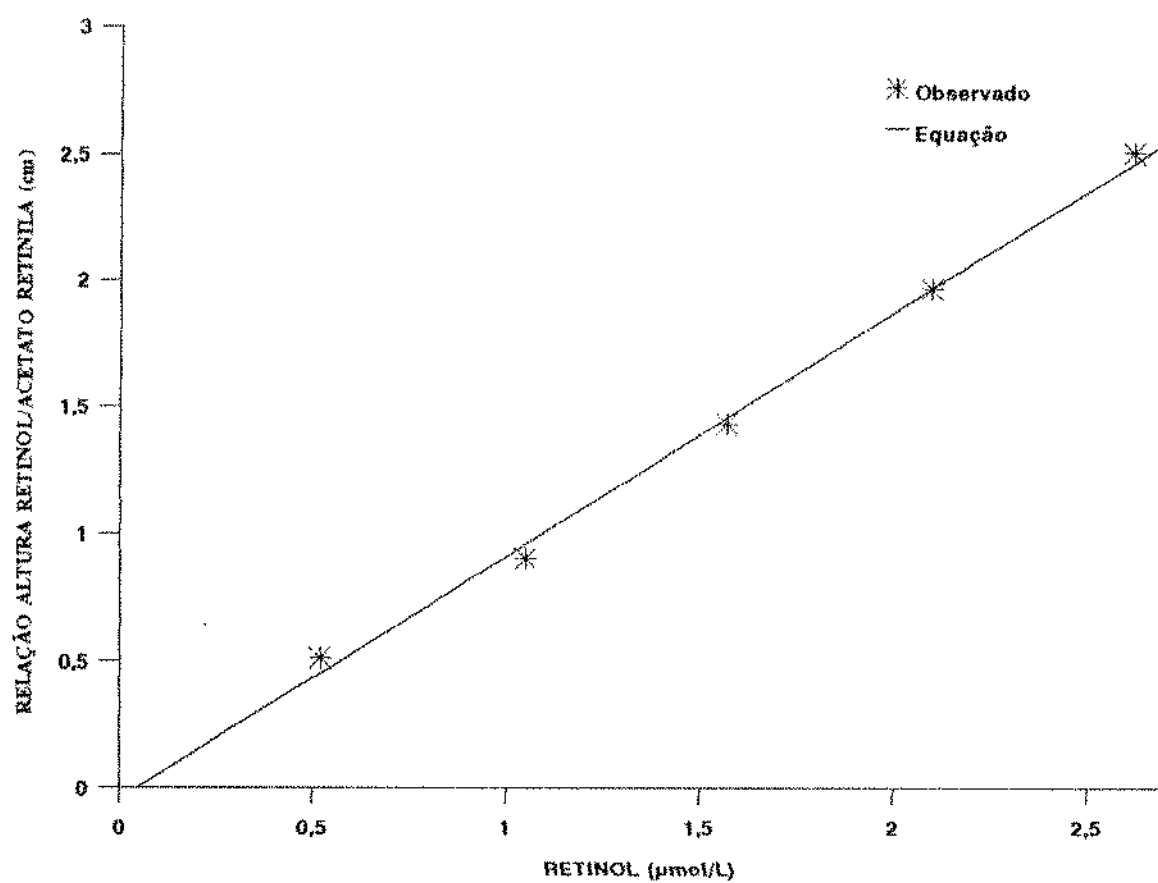


FIGURA 6 - CURVA PADRÃO DE RETINOL
EM "POOL" DE SORO NORMAL

A recuperação do retinol foi em média 89,8% com uma variação de 71 a 103% (Tabela 13). Os valores de recuperação encontrados neste trabalho são semelhantes àqueles obtidos pelo Autor do método (103,4%). Em estudos realizados por USHA *et al.* (1991) utilizando a mesma metodologia, a recuperação do retinol foi estimada em 83%.

TABELA 13 - Recuperação do retinol (%) adicionado ao "pool" de soro sem vitamina A.

RETINOL ADICIONADO ($\mu\text{mol/L}$)	RETINOL RECUPERADO* ($\mu\text{mol/L}$)	%
0,52	0,44	85
1,05	1,06	101
1,57	1,40	89
1,75	1,80	103
2,10	1,50	71

* Médias de duplicatas

5.3.3. Precisão e Reprodutibilidade

A precisão do método para o mesmo dia foi avaliada pela extração de 10 alíquotas no mesmo "pool" de soro. O valor médio encontrado para o retinol foi de $2,3 \mu\text{mol/L} \pm 0,14$ e o C.V. foi de 6,4%, ligeiramente superior a 4,1%, encontrado por BIERI *et al.* (1979). "Pool" de soro armazenado nas mesmas condições das amostras foi analisado, em duplicatas, durante 6 meses ($n = 36$). A média do retinol encontrada neste ensaio foi de $2,1 \mu\text{mol/L} \pm 0,20$ e o C.V. = 8,7%. Não houve diferença significativa entre os valores de retinol inicial e os valores repetidos ao longo de 6 meses ($P < 0,05$). Coeficiente de variação intra-ensaio de 9% foi obtido por USHA *et al.* (1991).

Para avaliar a reprodutibilidade do aparelho injetou-se padrão de vitamina A durante 10 dias. O C.V. para o mesmo dia foi 4,1 e para dias diferentes foi de 4,8%.

5.3.4. Dificuldades e adaptações realizadas

Nossos ensaios diferiram do método original proposto por BIERI *et al.* (1979) nos seguintes aspectos:

a) utilizou-se um volume maior de soro (200 μl) para extração. Por dificuldades técnicas não conseguimos pipetar o sobrenadante, após adição do hexano, trabalhando com 100 μl ;

b) na fase final do processo de extração, concentrou-se as amostras redissolvendo a vitamina em 100 μl ;

c) redissolveu-se a vitamina somente em metanol (fase móvel), em vez da mistura éter etílico:metanol. Em testes preliminares não houve diferença entre o uso de metanol apenas ou éter etílico + metanol.

5.4. Avaliação nutricional do estado de vitamina A

A avaliação nutricional das crianças com relação à vitamina A foi feita através de exame clínico ocular, consumo alimentar, exame citológico (CICO) e bioquímico (dosagem de retinol no soro).

5.4.1. Frequência de consumo alimentar

Ao analisar os dados do questionário de frequência alimentar primeiramente se fez uma interpretação com base nas categorias de risco, de forma a permitir a inferência do estado de vitamina A dos indivíduos (Tabela 14).

Nota-se, na Tabela 14, uma maior proporção de crianças (50,7%) na categoria considerada de baixo risco; 27,5% na categoria de médio risco e 21,7% na categoria de alto risco. Estes resultados sugerem que, apesar de metade das crianças apresentarem um consumo alimentar de vitamina A adequado (50,7%), isto é, não havendo risco de produzir uma depleção das reservas hepáticas, uma outra metade (49,3%) encontra-se com consumo de vitamina inferior ao requerimento mínimo basal (200-300 ER). Em geral, quando o consumo é inferior a dois-terços dos requerimentos (<250 ER), pode ocorrer depleção das reservas e evolução para a categoria de alto risco (IVACG, 1989).

TABELA 14 - Porcentagem de distribuição das crianças por categorias de risco de deficiência de vitamina A, segundo o IVACG (1989). Campinas, SP, 1991/1992

CATEGORIAS DE RISCO DE DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A	N	%
Baixo risco (escore ≥ 210)	70	50,7
Médio risco (escore 120 — 210)	38	27,5
Alto risco (escore < 120)	30	21,8

A frequência de consumo de alimentos pelas crianças está descrita na Tabela 15. Os resultados foram distribuídos segundo o consumo diário, semanal ou mensal de alimentos nos 30 dias anteriores à data de aplicação dos questionários.

Pela Tabela 15, verifica-se que, de uma maneira geral, a alimentação das crianças é bastante diversificada, apresentando um consumo variado de hortaliças, frutas e carnes.

Dos alimentos de maior frequência total, entre as hortaliças, destacam-se a batatinha, o tomate, a alface, a cenoura e a cebolinha que foram consumidos pelo menos por 50% das crianças (Figura 7). Entretanto, verificou-se ser o consumo diário pouco frequente (Tabela 15).

O consumo de frutas foi também regular, sendo a banana, laranja, melancia, mamão, manga e abacate, as mais consumidas (Figura 7).

Entre os produtos de origem animal a maioria das crianças consumiu algum tipo de carne pelo menos uma vez por semana, sendo o fígado e os miúdos de frango, fontes excelentes de vitamina A, consumidos por 42,0% e 36,2%, respectivamente. O ovo foi consumido por quase todas as crianças, estando presente na alimentação de dois terços delas pelo menos uma vez por semana (Figura 8).

A margarina é um alimento que teve um consumo diário por quase dois terços das crianças, enquanto a maionese esteve presente na alimentação de 50,7% (total).

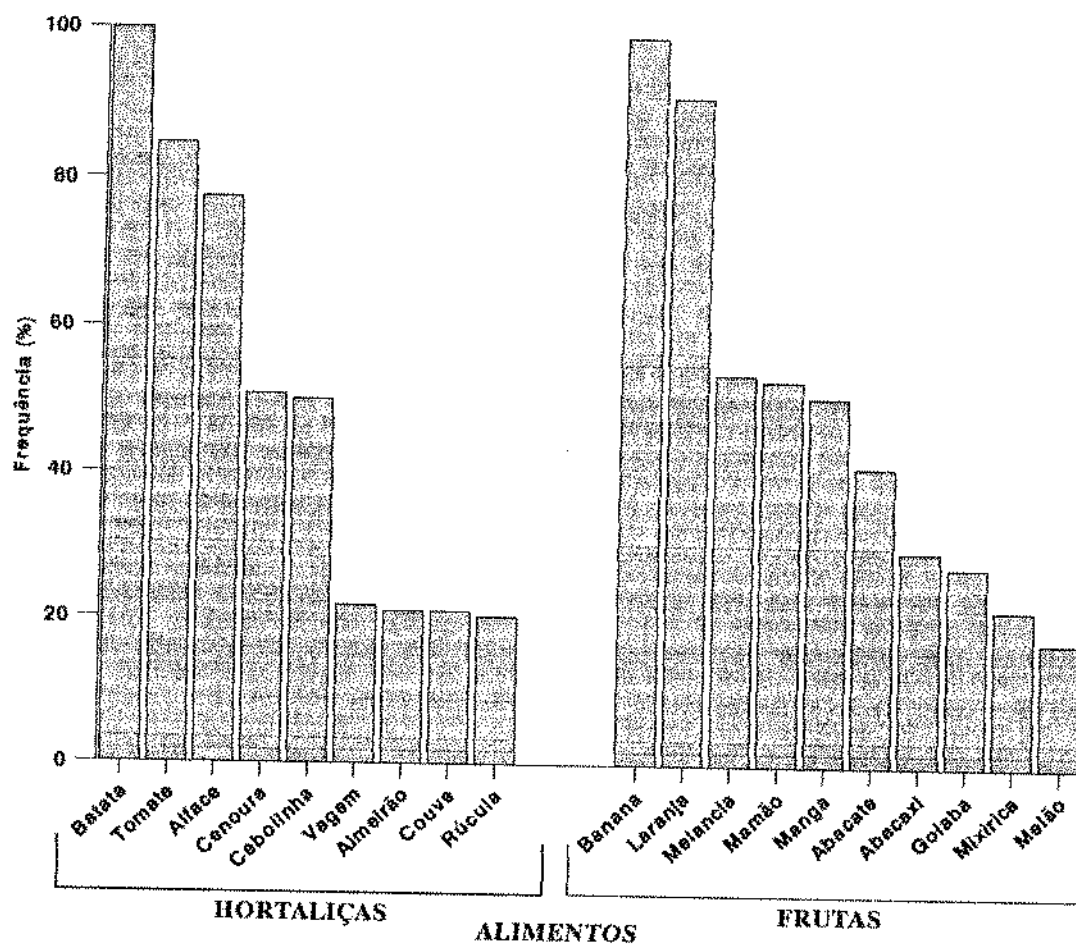
O leite, considerado boa fonte de vitamina A, nos primeiros anos de vida, teve um consumo expressivo (90,6%), apresentando uma ingestão diária em 47,1% das crianças.

TABELA 15 - Frequência de consumo dos alimentos pelas crianças. Campinas, SP, 1991/1992

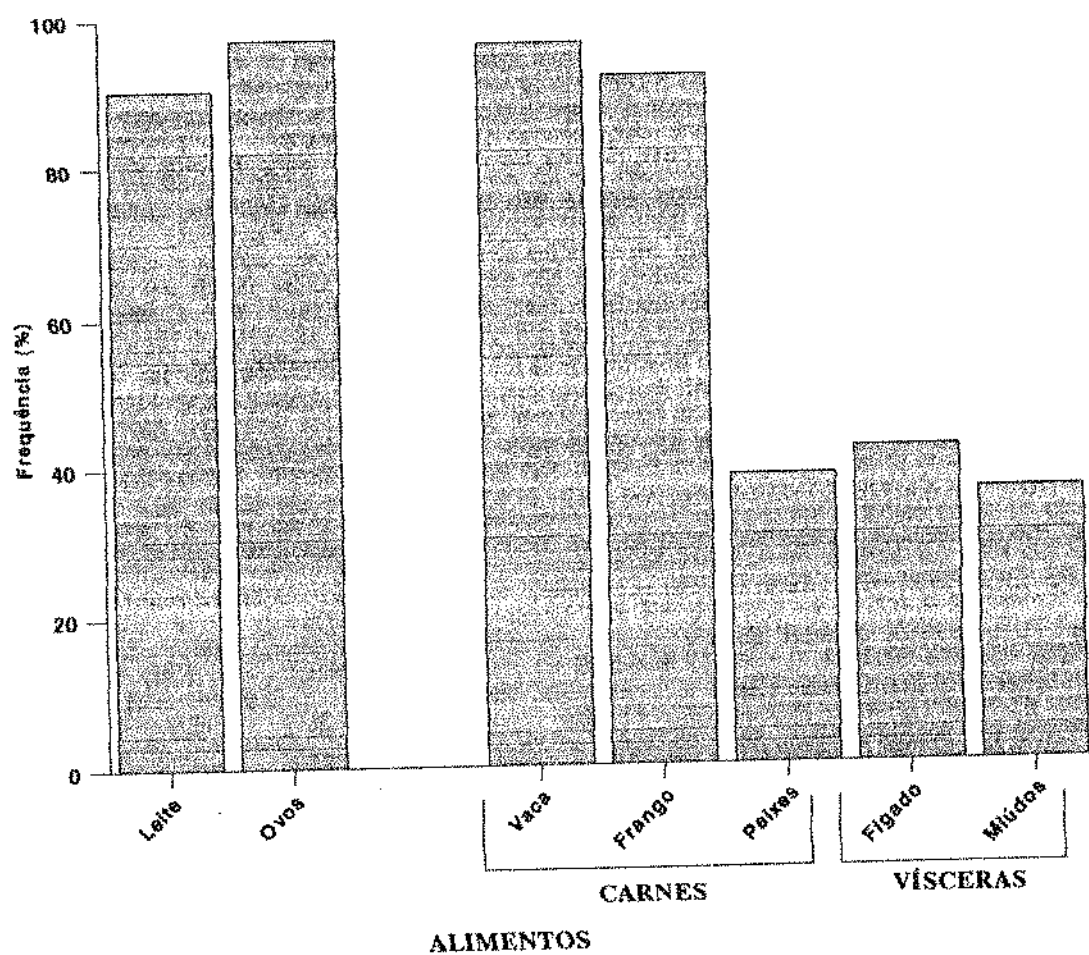
ALIMENTOS	FREQUÊNCIA DE CONSUMO							
	DIÁRIO		SEMANAL**		MENSAL		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Hortaliças:								
Batata	13	(19,4)	96	(69,6)	29	(21,0)	138	(100,0)
Tomate	17	(12,3)	32	(60,1)	18	(13,0)	117	(84,8)
Alface	5	(3,6)	68	(49,3)	34	(24,6)	107	(77,5)
Cenoura	5	(3,6)	35	(25,4)	30	(21,7)	70	(50,7)
Cebolinha	8	(5,8)	40	(29,0)	21	(15,2)	69	(50,0)
Pimentão	7	(5,1)	43	(31,2)	18	(13,0)	68	(49,3)
Chuchu	2	(1,4)	36	(26,1)	23	(16,6)	61	(44,2)
Couve-flor	0	(0,0)	20	(14,5)	19	(13,8)	39	(28,3)
Quiabo	0	(0,0)	20	(14,5)	17	(12,3)	37	(26,8)
Mandiocaquinha	1	(0,7)	22	(15,9)	13	(9,4)	36	(26,1)
Vagem	2	(1,4)	19	(3,8)	9	(6,5)	30	(21,7)
Almeirão	0	(0,0)	14	(10,1)	15	(10,9)	29	(21,0)
Couve	0	(0,0)	18	(13,0)	11	(8,0)	29	(21,0)
Rúcula	0	(0,0)	14	(10,1)	14	(10,1)	28	(20,3)
Chicória	0	(0,0)	13	(9,4)	8	(5,8)	21	(15,2)
Moranga	0	(0,0)	8	(5,8)	11	(8,0)	19	(13,8)
Agrião	1	(0,7)	6	(4,3)	3	(2,2)	10	(7,2)
Espinafre	1	(0,7)	2	(1,4)	6	(4,3)	9	(6,5)
Acelga	0	(0,0)	2	(1,4)	5	(3,6)	7	(5,1)
Brócolis	2	(1,4)	0	(0,0)	3	(2,2)	5	(3,6)
Frutas:								
Banana	21	(15,2)	98	(71,0)	18	(13,0)	137	(99,3)
Laranja	18	(13,0)	99	(71,7)	9	(6,5)	126	(91,3)
Melancia	1	(0,7)	31	(22,5)	40	(29,0)	74	(53,6)
Mamão	4	(3,0)	40	(29,0)	29	(21,0)	73	(52,9)
Manga	19	(13,8)	34	(24,6)	17	(12,3)	70	(50,7)
Abacate	3	(2,2)	24	(17,4)	30	(21,7)	57	(41,3)
Abacaxi	0	(0,0)	21	(15,2)	21	(15,2)	41	(29,7)
Goiaba	2	(1,4)	17	(12,3)	19	(13,8)	38	(27,5)
Mixirica	0	(0,0)	17	(12,3)	13	(9,4)	30	(21,7)
Melão	0	(0,0)	11	(8,0)	13	(9,4)	24	(17,4)
Pera	0	(0,0)	3	(2,2)	14	(10,1)	17	(12,3)
Morango	0	(0,0)	3	(2,2)	7	(5,1)	10	(7,2)
Figo	0	(0,0)	2	(1,4)	4	(2,9)	6	(4,3)
Leite:	65	(47,1)	47	(34,1)	13	(9,4)	125	(90,6)
Carnes:								
Vaca	14	(10,1)	95	(68,8)	24	(17,4)	133	(96,4)
Frango	7	(5,1)	104	(75,4)	16	(11,6)	27	(20,0)
Linguiça	0	(0,0)	50	(36,2)	33	(23,9)	83	(60,1)
Peixes	0	(0,0)	28	(20,3)	25	(18,1)	53	(38,4)
Visceras:								
Fígado	0	(0,0)	22	(15,9)	36	(26,1)	58	(42,0)
Miúdos	0	(0,0)	24	(17,4)	26	(18,8)	50	(36,2)
Ovos	15	(10,9)	95	(68,8)	24	(17,4)	134	(97,1)
Outros:								
Margarina	85	(61,6)	28	(20,3)	1	(0,7)	114	(82,6)
Maionese	4	(2,9)	40	(29,0)	26	(18,8)	70	(50,7)

*Consumo de no mínimo uma vez por semana

** Consumo de uma a três vezes durante o último mês da data de realização da entrevista



**FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DOS ALIMENTOS
MAIS CONSUMIDOS POR 138 CRIANÇAS.
CAMPINAS, SP, 1992/1992.**



**FIGURA 8 - FREQUÊNCIA DOS ALIMENTOS
MAIS CONSUMIDOS POR 138 CRIANÇAS.
CAMPINAS, SP, 1992/1992.**

Percebe-se pela listagem da frequência alimentar uma evidência bastante suficiente de que a dieta das crianças foi qualitativamente adequada. Os dados do inquérito mostram que, de certa forma, as crianças têm o hábito de consumir frutas e verduras pelo menos uma vez por semana.

Queremos enfatizar que a maioria das hortaliças e frutas são ganhos nas feiras livres, onde é comum a utilização da mão de obra infantil remunerada com frutas e verduras. Além disso, é prática comum de muitas famílias recolherem restos de frutas e verduras no final das feiras.

Algumas famílias têm o hábito de plantar. Registrou-se em 15% as famílias que relataram ter produção própria de algum tipo de árvore frutífera ou verdura no quintal de casa.

Uma alternativa privilegiada em algumas favelas é a doação de alimentos para as famílias mais necessitadas. Isto ocorre principalmente nas favelas mais organizadas que de alguma forma recebem apoio da prefeitura ou de grupos religiosos. Há casos onde os vizinhos suprem a alimentação de algumas crianças quando os pais estão desempregados. Como um grande número de crianças vive nas ruas, frequentemente ganham ou pegam alimentos nas feiras (ou até mesmo nos lixos, conforme informação de algumas mães).

O fato das crianças consumirem pelo menos uma vez por mês alimentos considerados boas fontes de vitamina, justifica em parte, termos encontrados os baixos índices de retinol no soro em situação ainda não alarmante. No entanto, não podemos ignorar o achado de que quase 50% das crianças encontram-se na categoria de médio e alto risco.

5.4.2. Exame oftalmológico

Nenhum sinal indicativo da presença de xeroftalmia foi encontrado na avaliação clínica ocular sob luz ambiente. Nas 26 crianças examinadas com aparelhos por oftalmologistas, as alterações observadas foram as seguintes:

Hipermetropia	03 casos
Melanose da conjuntiva	02 casos
Crosta seborréicas	01 caso
Conjuntivite alérgica	01 caso
Astigmatismo	01 caso

Em 18 casos não houve alteração. Apesar de várias limitações, os métodos clínicos oculares são muito utilizados na avaliação do estado de vitamina A em crianças. Entretanto esta metodologia é sensível apenas em casos de deficiência grave. Embora casos de xeroftalmia grave tenham sido relatados no Estado da Paraíba (SANTOS *et al.*, 1983b) e no Vale do Jequetinhonha em Minas Gerais (ARAÚJO *et al.*, 1986), segundo OLIVEIRA *et al.*, (1990), os levantamentos sobre hipovitaminose A existentes no Brasil, identificados pelo uso dos sinais clínicos, são inconsistentes

5.4.3. Avaliação citológica (CICO)

5.4.3.1. Aceitabilidade pela criança

A Tabela 16 mostra a aceitação pelas crianças ao método de citologia de impressão da conjuntiva ocular (CICO). Para o total de 341 crianças investigadas, a CICO foi realizada em 87,4%, o que significa uma rejeição de 12,7%. A maior parte das perdas (10,6%) ocorreu na faixa etária entre 3 e 6 anos.

**TABELA 16 - Aceitabilidade ao exame da CICO, segundo a idade das crianças.
Campinas, SP, 1991/1992.**

GRUPO ETÁRIO (Anos)	NÚMERO DE CRIANÇAS	ACEITABILIDADE			
		BOA		RUIM	
		N	%	N	%
3-6	154	118	34,6	36	10,6
6-10	153	147	43,1	6	1,8
10-11	34	33	9,7	1	0,3
TOTAL	341	298	87,4	43	12,7

Das 298 crianças examinadas pela CICO, em 96% (n=286) conseguiu-se realizar o exame nos dois olhos. No restante (4%, crianças de 3 a 6 anos) o exame foi realizado em apenas um olho. Em estudos semelhantes, KJOLHEDE *et al.* (1989) alcançaram sucesso na realização do exame em 96% de 246 crianças. O efeito da idade na aceitação do exame foi discutida pelos Autores, sendo o procedimento mais difícil em menores de 3 anos. NATHANAIL & POWERS (1992) obtiveram perdas maiores (17%), mostrando também maiores porcentagens em crianças com idade inferior a 3 anos.

Uma pesquisa realizada no Brasil mostrou que as maiores perdas ocorreram em crianças de tenra idade. O material conjuntival para os dois olhos foi obtido em 51% das crianças com mais de 3 anos de idade, enquanto para os menores de 3 anos só conseguiu-se material conjuntival para os dois olhos em 36% (RODRIGUES GONÇALVES *et al.*, 1993).

A porcentagem de 12,7% de perdas obtidas nesta pesquisa é relativamente pequena. Os motivos do rechaço são a falta de cooperação da criança em permanecer com o olho bem aberto e, ao mesmo tempo, com o olhar fixo para o lado oposto durante a realização do exame.

A coincidência da CICO apresentar menor aceitabilidade entre os pré-escolares é uma grande limitação visto que é essa, justamente, a faixa etária de maior vulnerabilidade à hipovitaminose A. Segundo NATHANAIL & POWERS (1992), as crianças mais afetadas pela xerofthalmia estão na faixa etária de 2 a 5 anos, com pico de incidência entre os 3 e 4 anos.

5.4.3.2. Prevalência de hipovitaminose A pela CICO

Para avaliar o estado de vitamina A das crianças pela CICO, adotou-se o critério de classificação mais simples. Na categoria normal ou negativo, foram classificados os casos com número de células caliciformes igual ou superior a cinco; e na categoria anormal ou positivo, todos os casos com menos do que cinco células caliciformes (ICEPO, 1988; NATADISASTRA *et al.*, 1987; WITPPENN *et al.*, 1988).

A frequência de distribuição das células caliciformes encontradas no papel de celulose em ambos os olhos ou em apenas um olho encontra-se no Anexo 1.

Os resultados condensados da prevalência de hipovitaminose A pelo exame da CICO em 298 crianças, encontram-se na Tabela 17. Pode-se verificar, nesta tabela, que a porcentagem de crianças normais foi 91,3, enquanto que a de anormais foi apenas 2,0%. É importante citar a existência de 5 casos que foram diagnosticados positivos (anormais) na primeira tentativa e que, na repetição do exame os diagnósticos foram negativos. Este resultado revestiu uma certa importância porque mostra a possibilidade de diagnósticos citológicos falsos positivos, sendo que tal peculiaridade sobre os resultados das repetições não é mencionada pela maioria dos autores. É lógico que desvantagem semelhante é compartilhada com todos os métodos de diagnóstico que usam como referência limites próximos de zero, devido a dificuldades como falta de sensibilidade e perdas da entidade a ser quantificada. Foi observado, desvantagem adicional das perdas ainda não controláveis discutidas no item 5.4.3.3.

**TABELA 17 - Prevalência de hipovitaminose A pela CICO em 298 crianças.
Campinas, SP, 1991/1992.**

CICO	N	%
Normal	272	91,3
Anormal	6	2,0
Inconclusivo*	20	6,7
TOTAL	298	100,0

*Material insuficiente para diagnóstico (falta de aderência de células conjuntivais ao papel ou coloração inadequada).

Uma outra abordagem que não se poderia deixar de considerar, foi a grande variação observada na distribuição do número de células caliciformes. Em cerca de 11% dos casos, o diagnóstico foi positivo (anormal) em um olho e negativo (normal) no outro, em um mesmo indivíduo.

Em estudo fotográfico sobre a densidade das células caliciformes, KESSING (1966) demonstrou enorme variação destas células em diferentes locais da conjuntiva ocular. Em sua investigação o quadrante nasal revelou duas vezes mais células caliciformes em comparação com o temporal.

Mais recentemente, EGBERT *et al.* (1977) investigaram a distribuição das células caliciformes, demonstrando que estas células não estão uniformemente distribuídas pela conjuntiva, sendo maior no quadrante nasal palpebral do que no temporal palpebral.

É provável, portanto, que os falsos diagnósticos, assim como a falta de concordância dos resultados entre os dois olhos decorram de erros durante a coleta. O diagnóstico basicamente depende da técnica de coleta, sendo que variações na quantidade de células caliciformes sob a superfície conjuntival podem levar a erros.

As experiências vividas no decorrer deste trabalho demonstraram que a técnica de coleta de células da conjuntiva foi um dos pontos mais críticos do método. Alguns fatores interferem e dificultam a aderência de células conjuntivais ao papel de celulose. Por exemplo, menor exposição do globo ocular peculiar de cada indivíduo, a área específica da conjuntiva aonde o papel deverá ser colocado (porção superior, média ou inferior). Na prática, muitas vezes é difícil controlar e padronizar essas condições, principalmente quando a criança "mexe" ou "pisca" no momento de puxar o papel da conjuntiva. Todos esses fatores, aliados à distribuição irregular das células caliciformes sob a conjuntiva dificultam padronizar a área e a quantidade de material celular a ser coletado, podendo alterar a qualidade das amostras e levar a erros no diagnóstico.

Como o exame da CICO é facilmente repetido acreditamos que a melhora na precisão do diagnóstico será conseguida pela repetição do exame nos casos positivos (anormal) e quando a quantidade de material coletado for insuficiente.

5.4.3.3. Leitura direta no papel de celulose (PC) x leitura na lâmina (LL)

Para 26,2% (n=78) das amostras não houve transferência das células do papel para a lâmina, como pode ser apreciado na Tabela 18. Os motivos que levaram a falta de transferência das células do papel para a lâmina são desconhecidos.

TABELA 18 - CICO: Comparação da leitura direta no papel de celulose com a leitura feita na lâmina.

CRITÉRIOS	TIPO DE OBSERVAÇÃO			
	SOBRE LÂMINA		SOBRE PAPEL DE CELULOSE	
	N	%	N	%
Falta de aderência*	78	26,2	20	6,7
Normal	210	70,5	272	91,3
Anormal	19	6,4	6	2,0
TOTAL	298	100,0	278	100,0

*Perdas por falta de transferência de células do papel de celulose para a lâmina.

SAMBA *et al.* (1990), utilizando o mesmo procedimento, tiveram perdas maiores (33%) pela falta de aderência das células à lâmina. Os Autores comentaram o efeito de ambientes com temperaturas elevadas ($>30^{\circ}\text{C}$ e umidade de 80% na transferência insatisfatória de células do papel de celulose para a lâmina. ESCOUTE *et al.* (1991) fazendo um estudo de prevalência de hipovitaminose A em 650 crianças tiveram perdas de 18% nas amostras por falta de transferência das células para lâmina. A possibilidade da temperatura ter interferido neste processo é apontada também pelos Autores.

Mais recentemente, uma pesquisa desenvolvida por CARLIER *et al.* (1991b) sobre o estado de vitamina A nas crianças em Diourbel, Fatick e Kaolack (Senegal) acusaram perdas de 11%. Apontam os Autores que a falta de transferência das células do papel de celulose para a lâmina se deve às dificuldades apresentadas pelas crianças na hora do exame, e que temperaturas em torno de 35 a 40°C com ambiente seco não afetam as propriedades do papel de celulose. Muitas vezes as crianças ficam tensas e isto dificulta a coleta das células; como consequência, a quantidade de material é insuficiente para aderir à lâmina.

Vale lembrar que esta pesquisa também foi realizada nas horas quentes do dia ($>30^{\circ}\text{C}$). É provável que o calor possa ter contribuído para perdas de células no processo de transferência mas, por outro lado, acreditamos que as dificuldades oferecidas por algumas crianças na hora da coleta possa contribuir para reduzir no número de células a aderirem ao papel de celulose.

Comparando-se os resultados alcançados pelos dois procedimentos, verificou-se que, das 19 observações feitas na lâmina com diagnóstico anormal, em 13 o resultado foi inadequado, indicando que o resultado conclusivo dos casos anormais deve ser feito pela leitura direta no papel de celulose (PC).

LUZEAU *et al.* (1988), estudando um grupo de 40 pacientes hospitalizados na faixa de idade entre 25 e 60 anos, obtiveram uma taxa de 97,5% na confiabilidade das observações feitas na lâmina (LL), em relação ao método original (PC).

A comparação entre os dois procedimentos também foi realizada por SAMBA *et al.* (1990). De acordo com os Autores, a confiabilidade das observações feitas diretamente na lâmina foi 97%, apresentando-se apenas 4, de 129 casos, com diagnóstico inadequado.

Apesar de existir uma falta de concordância entre as leituras pelos dois procedimentos (PC x LL), um aspecto importante a ser considerado é a praticidade quando a leitura é feita apenas na lâmina, além do custo ser menor. A CICO, por outro lado, apresenta algumas dificuldades em virtude das diversas fases que envolvem a técnica de coloração. Para resguardar a integridade do papel de celulose é necessário tomar muito cuidado na execução de cada passo. As fases que envolve o processo de coloração são delicadas, e para se conseguir transparência e qualidade de coloração do papel de celulose é necessário experiência e muita atenção. A montagem do papel de celulose nas lâminas é também outra etapa delicada por causa do relevo ocasionado pelo papel ao se cobrir com a laminula. Todas essas considerações não são necessárias no procedimento de coloração da lâmina.

Portanto, considerando as facilidades da fase de coloração a técnica da leitura na lâmina é utilizada preferencialmente por diversos autores. Embora a simplicidade do método seja indiscutível, muita cautela deve ser dada na interpretação das lâminas e na conclusão diagnóstica. Tendo em vista a facilidade de diagnósticos falsos positivos pela leitura somente na lâmina, é necessário guardar o papel de celulose, e repetir a leitura de todos os casos positivos. Um inconveniente observado foi a quebra do papel de celulose quando se fazia a transferência das células do papel para a lâmina.

5.4.4. Prevalência de hipovitaminose A pelas dosagens de retinol no soro

Do total da amostra pesquisada (n=341) foram selecionadas 138 crianças para a coleta de sangue, e dessas, as dosagens de retinol foram realizadas em 131. Nas restantes (5,1% ou n=7) houve hemólise.

A distribuição das frequências dos valores de retinol no soro para cada criança estudada estão discriminadas no Anexo 2.

O valor médio de retinol no soro das crianças estudadas foi $0,97 \pm 0,026$ $\mu\text{mol/L}$ ou $28\mu\text{g/dl}$ ($\text{IC}=0,92-1,02$ 95%); isto é, 66% da média francesa para crianças normais (MALVY *et al.*, 1989) e o dobro da média de crianças do Senegal (AMÉDÉE-MANESME & De MAEYER, 1989). A mediana foi $0,93\mu\text{mol/L}$ ou $27\mu\text{mol/L}$ (Figura 9).

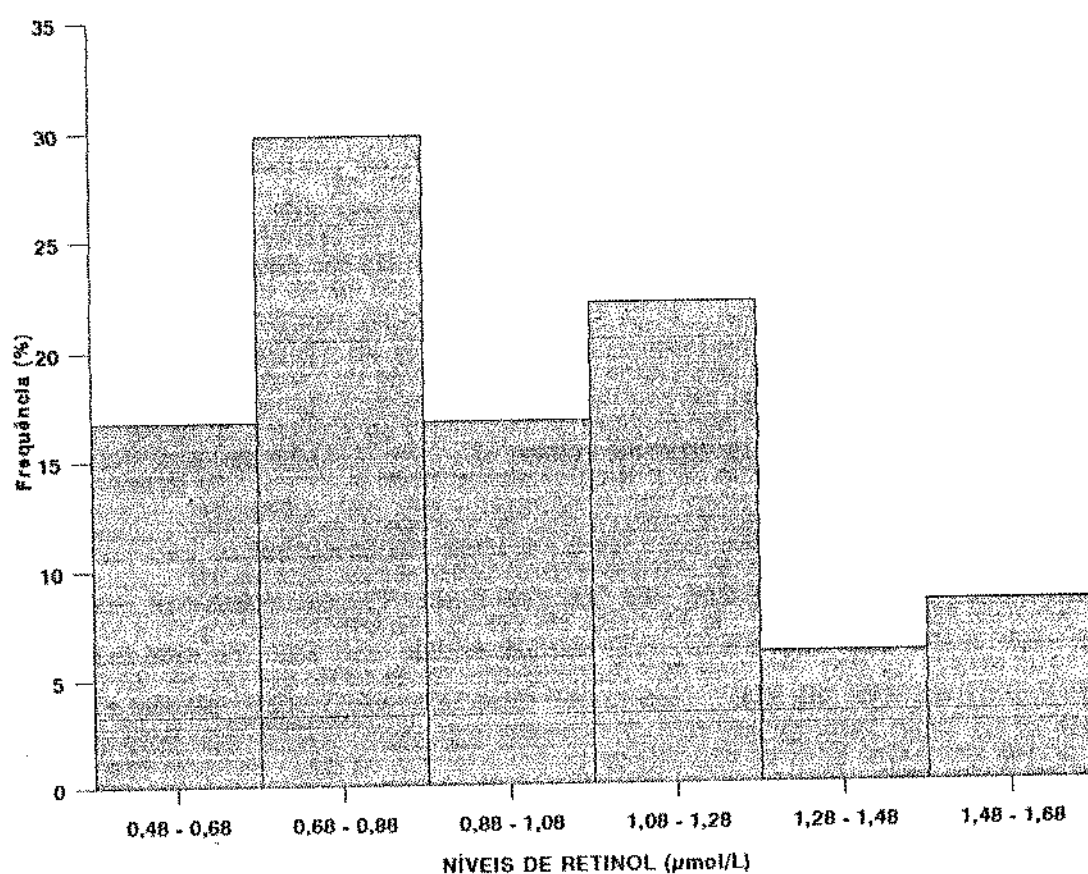


FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO (%) DOS NÍVEIS DE RETINOL NO SORO DE 131 CRIANÇAS. CAMPINAS, SP, 1991/1992.

Observando-se as faixas de variação, nota-se que os dados do presente estudo mostram menor dispersão do que os dados da região de Tour na França (MALVY *et al.*, 1989) ou do Senegal (AMÉDÉE-MANESME & DeMAEYER, 1989). Entre os fatores que podem determinar a amplitude de variação, devem ser considerados o tamanho da amostra, a abrangência geográfica (que por sua vez está relacionada com as fontes alimentares disponíveis) e o método de avaliação utilizado.

O coeficiente de variação (CV) encontrado para a população avaliada foi 30,7%, está dentro da faixa de 20 a 30%, considerada normal por OLSON (1984).

FLORES *et al.* (1991), avaliando crianças de 2 a 6 anos de idade (n = 544) de favelas de Recife, encontraram o valor médio de $0,82 \pm 0,24$ e uma mediana de $0,86 \mu\text{mol/L}$. A faixa de variação observada foi de $0,26$ a $1,91 \mu\text{mol/L}$. A média está próxima da relatada neste estudo, para a faixa etária de 3 a 6 anos ($0,96 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$, Tabela 19), embora a amplitude de variação tenha sido mais estreita para as crianças de Campinas ($0,48$ a $1,64 \mu\text{mol/L}$ ou 14 a $47 \mu\text{g/dl}$). O fato de o menor valor ter sido mais alto, e o maior mais baixo do que os encontrados por aqueles Autores permite sugerir, mas não afirmar, que a amostra de Campinas seja mais homogênea.

TABELA 19 - Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos níveis de retinol no soro, segundo a idade das crianças. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPO ETÁRIO (Anos)	N	RETINOL($\mu\text{mol/L}$)		
		$\bar{x} \pm \text{DP}$	MIN	MAX
3-6	56	$0,96 \pm 0,29$	0,48	1,64
6-11	75	$0,97 \pm 0,31$	0,48	1,68

$p = 0,980$ (Teste t de Student)

TABELA 20 - Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos níveis de retinol no soro segundo o sexo das crianças. Campinas, SP, 1991/1992.

SEXO	N	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)		
		$\bar{x} \pm \text{DP}$	MIN	MAX
Masculino	57	$0,92 \pm 0,28$	0,49	1,64
Feminino	74	$1,00 \pm 0,31$	0,48	1,68

$p = 0,093$ (teste t de Student)

As Tabelas 19 e 20 apresentam os resultados dos valores médios de retinol segundo a idade e o sexo das crianças, respectivamente. Analisando-se os dados de acordo com a idade, verifica-se valores médios de retinol praticamente semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os pré-escolares e os escolares ($0,96$ e $0,97 \mu\text{mol/L}$, respectivamente). As diferenças observadas de acordo com o sexo, apresentam a existência de valores ligeiramente maiores para as meninas ($1,01 \pm 0,31 \mu\text{mol/L}$) em relação aos meninos ($0,92 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$), mas sem apresentar diferenças significativas ($p=0,093$).

A influência do sexo nos níveis sorológicos de retinol é apontada por vários autores havendo, entretanto, discordância, quanto à significância. Alguns relataram maiores níveis de retinol em meninos (RONCADA, 1972; WHO, 1976), enquanto outros afirmam ser as diferenças não significativas (RONCADA *et al.*, 1984; MALVY *et al.*, 1989; WOLDE-GEBREL *et al.*, 1991; RANKINS *et al.*, 1993), ou encontram maiores níveis nas meninas (SUTHUVORAVOOT & OLSON, 1974; BLOEM *et al.*, 1989).

Segundo LEWIS *et al.* (1990) as diferenças observadas nos níveis sanguíneos de retinol entre os sexos são de menor magnitude em crianças quando comparadas com aquelas relatadas em adultos. Valores de 0,070 $\mu\text{mol/L}$ (2 $\mu\text{g/dl}$) foi a diferença máxima encontrada entre os meninos e meninas, enquanto diferenças de até 0,35 $\mu\text{mol/L}$ (10 $\mu\text{g/dl}$) foi reportado como mais baixo nas mulheres do que em homens.

Com relação à idade os resultados aqui encontrados não dão apoio à proposta de LEWIS *et al.* (1990) de que crianças mais jovens (4-5 anos) tendem a mostrar níveis de retinol sérico mais baixos do que entre os 9 e 11 anos.

Aceitando o critério proposto pelo ICNND (1963), que considera normais somente níveis acima de 20 $\mu\text{g/dl}$ ($> 0,70\mu\text{mol/L}$), sem distinção de sexo ou idade, constatou-se para o total da amostra, uma prevalência de hipovitaminose A de 17,6% com níveis de retinol entre 0,30-0,70 $\mu\text{mol/L}$ (10 e 20 $\mu\text{g/dl}$). Os resultados referentes à prevalência de hipovitaminose A, por faixa etária e sexo encontram-se nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

TABELA 21 - Prevalência de hipovitaminose A em crianças de 3 a 10 anos, pelo método de dosagem de retinol no soro, segundo a idade. Campinas, SP, 1991/1992.

GRUPO ETÁRIO (Anos)	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)			
	BAIXO		ACEITÁVEL	
	N	%	N	%
3-6	9	6,9	47	35,9
6-11	14	10,7	61	46,6
TOTAL	23	17,6	108	82,4

$p = 0,87750$ (Teste Qui-quadrado)

TABELA 22 - Prevalência de hipovitaminose A em crianças de 3 a 10 anos, pelo método de dosagem de retinol no soro, segundo o sexo. Campinas, SP, 1991/1992.

SEXO	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)			
	BAIXO		ACEITÁVEL	
	N	%	N	%
Masculino	12	9,2	45	34,3
Feminino	11	8,4	63	48,1
TOTAL	23	17,6	108	82,4

$p = 0,48939$ (Teste Qui-Quadrado)

Não foi detectada interação significativa entre o sexo e idade das crianças com ou sem deficiência de vitamina A, embora maior prevalência foi observada em crianças com idade igual ou superior a 6 anos (Tabelas 21 e 22).

Tem sido amplamente relatado que a prevalência de hipovitaminose A alcança índices alarmantes e anualmente, os casos se repetem e até aumentam entre muitos países em desenvolvimento. Mesmo nas suas formas leves ou moderadas, estima-se que a incidência se situa entre 6 e 7 milhões de casos, para uma prevalência de 20 a 40 milhões (HORWITZ, 1989).

No Brasil, apesar das informações sobre a extensão da hipovitaminose A serem insuficientes e geograficamente esparsas, BATISTA FILHO & CARTAGENA (1985) consideram a deficiência de vitamina A um problema de Saúde Pública no país.

O ICNND (1965) que estudou o problema da hipovitaminose A no Brasil de forma mais abrangente, constatou uma frequência de 60% para níveis de retinol inferiores a 20µg/dl. O IBGE (1982) também verificou que as dietas dos brasileiros são indicativas de hipovitaminose A no país. Estudos mais recentes vêm confirmando estes achados, embora não forneçam uma avaliação quantitativa da problemática como um todo (SANTOS *et al.*, 1983a; SHRIMPTON, 1989).

No Estado de São Paulo, a prevalência de hipovitaminose A é apontada como tendo proporções graves. Dados coletados por RONCADA na década de 70 demonstraram níveis séricos de vitamina A abaixo de 20µg/dl em um grande número de casos. Nos anos 80, RONCADA *et al.* (1984), ainda encontraram uma situação alarmante. Cerca de 30,2% das crianças tinham níveis séricos de retinol abaixo de 20µg/dl.

Os achados bioquímicos relatados por WILSON *et al.* (1981) sobre a magnitude da prevalência da hipovitaminose A em crianças de 2 a 6 anos de idade, revelaram um quadro mais grave. Cerca de 73,9% dos examinados tinham níveis plasmáticos de vitamina A abaixo de 20µg/dl, enquanto 39,4% tinham níveis abaixo de 10 µg/dl.

FAVARO *et al.* (1986a) encontraram na região de Ribeirão Preto níveis circulantes de vitamina A semelhantes aos já relatados em crianças da Indonésia, para crianças consideradas de alto risco; ou seja, 47,2% apresentaram níveis de retinol inferiores a 20µg/dl e 1,8% níveis inferiores a 10µg/dl.

De acordo com ARROYAVE *et al.* (1981), quando pelo menos 15% ou mais da população apresentam níveis de vitamina A no soro abaixo de 20µg/dl e/ou 5% ou mais tem valores inferiores a 10µg/dl a hipovitaminose A passa a ser considerada um problema de Saúde Pública.

GADOMSKI *et al.* (1989), conduzindo um trabalho semelhante ao nosso na Guatemala em grupo de pré-escolares, encontraram prevalência de 18% de níveis de retinol inferiores a $0,70\mu\text{mol/L}$, e nenhum caso com valores menores do que $0,35\mu\text{mol/L}$ foi identificado. A prevalência da deficiência de vitamina A através de sinais clínicos é desconhecida, e não há relatos recentes de casos de cegueira nutricional na região. Apesar da deficiência de vitamina na Guatemala ter apresentado índices menos severos do que os constantemente relatados na Indonésia e na Índia, os valores de retinol inferiores a $0,70\mu\text{mol/L}$ (18% da população) estão acima dos apontados pelo ICNND como determinantes para um problema de Saúde Pública.

Os resultados encontrados nesta pesquisa também mostram percentuais elevados, de níveis inferiores a $0,70\mu\text{mol/L}$ em cerca de 17,6%, distribuídos em 6,9% para pré-escolares e 10,7% para escolares. Estes dados evidenciam que as crianças residentes nas favelas de Campinas constituem um grupo de alto risco, podendo evoluir para as formas mais graves da hipovitaminose A.

Lembramos ainda que nos casos marginais o risco de evoluir para a categoria deficiente é muito grande, pois qualquer fator externo (queda súbita no consumo ou aumento nos requerimentos da vitamina) poderão baixar acentuadamente e drasticamente os níveis de retinol sérico. Muitos trabalhos citam que os episódios infecciosos são capazes de promover rapidamente uma depleção das reservas hepáticas de vitamina A e uma queda nos níveis de retinol circulantes (ARROYAVE & CALCANO, 1979; CAMPOS *et al.*, 1987).

Um fato interessante chamou a atenção de CAMPOS *et al.* (1987), na presença ou não de sinais clínicos ou níveis bioquímicos característicos de hipovitaminose A, crianças pobres passam de marginal ($10\text{-}20\mu\text{g/dl}$) a deficiente ($< 10\mu\text{g/dl}$) após uma infecção, mesmo sem manifestar sintoma de doença.

SOMMER *et al.* (1984) e SOMMER *et al.* (1986) demonstraram ser a xeroftalmia nas suas mais diversas formas, um grande fator de risco para o aumento nos coeficientes de mortalidade na infância. O estado de nutrição quando avaliado por parâmetros antropométricos é um fator significativo de risco para o surgimento da xeroftalmia. Embora os resultados da literatura sejam discordantes, ARROYAVE &

CALCANO (1979), encontraram associação entre o estado "stunting" e todas as formas de xerofthalmia.

Os resultados antropométricos encontrados neste estudo mostraram sinais de desnutrição, da mesma forma que a dieta foi inadequada para o crescimento normal. Certamente, que se medidas de prevenção e controle não forem implementadas no combate à hipovitaminose A, e na proteção dos outros grupos de risco ao surgimento da xerofthalmia, a evolução para estados mais graves poderá acontecer ou comprometer irreversivelmente o crescimento e a capacidade física final das crianças de favelas de Campinas.

Diante dos resultados aqui relatados, é perfeitamente viável a implantação de programas entre as universidades e a Secretária de Saúde do Município a fim de que técnicos sejam treinados e projetos sejam desenvolvidos no sentido de beneficiar a população mais afetada. É importante ainda que outras pesquisas sejam desenvolvidas na região para o estudo de outros grupos potencialmente vulneráveis.

5.5. Comparação da CICO com as dosagens de retinol no soro por CLAE

Muitos sistemas de classificação dos resultados têm sido propostos para o método de citologia de impressão da conjuntiva ocular (WITTPENN *et al.*, 1986; KEENUM & *et al.*, 1990). A diferença entre eles basicamente reside na definição dos diversos estágios citológicos observados na deficiência de vitamina A, sendo que todos incluem pelo menos quatro estágios. Na classificação de cada estágio a avaliação quantitativa de células caliciformes é feita conjuntamente com as alterações morfológicas das células epiteliais.

De maneira geral, à medida que o número de células caliciformes diminui mudanças morfológicas nas células epiteliais ocorrem, intensificando-se até o processo de completa ceratinização. Neste estágio, observa-se ausência total de células caliciformes. Dessa maneira, quando se faz o diagnóstico citológico com base nestes dois tipos de alterações (células caliciformes/células epiteliais) a reprodutibilidade do método é baixa, pois apenas na leitura dos casos normais mostra-se quase total concordância (WITTPENN *et al.*, 1986; KJOLHEDE *et al.*, 1989; KEENUM *et al.*, 1990; CARLIER *et al.*, 1992).

Para atender em parte essas dificuldades, alguns autores sugerem que sejam dois os estágios de classificação (AMÉDÉE-MANESME *et al.*, 1988; SHARMA & UNDERWOOD, 1989; CARLIER *et al.*, 1992). Através da nossa experiência foi possível constatar que classificando-se as alterações citológicas em normal e anormal, o que leva em consideração simplesmente a presença ou ausência de células caliciformes, além de mais reprodutível, o método se torna mais simples.

Segundo DOHLMAN & KALEVAR citados por SOMMER *et al.* (1981a), o processo de ceratinização independe da perda de células caliciformes. Também SOMMER *et al.* (1981a) estudando crianças gravemente desnutridas, confirmaram estes achados demonstrando haver ausência de ceratinização e completa perda de células caliciformes.

Neste trabalho, inicialmente aplicou-se o critério dos dois estágios para a classificação da CICO, com base no mesmo ponto de corte sugerido pelo ICEPO (1988): normal ($\geq$ que cinco células caliciformes) e anormal ($<$ que cinco células caliciformes).

Durante a leitura das amostras verificou-se grande variação na quantidade de células caliciformes. Em alguns casos havia abundância, em outros havia quantidade moderada ou pequena; havia casos com raras células e outros em completa ausência de células caliciformes (Fotos: 3, 4, 5, 6). Para minimizar este efeito tentou-se otimizar o processo quantitativo de células caliciformes. Como primeiro passo ampliou-se o limite de quantificação destas células em quatro classes.

FOTO 3 - CICO NORMAL, abundantes células caliciformes, PAS⁺. Coloração adicional com Hematoxilina de Harris; aumento: a = 100x e b = 200x.

FOTO 4 - CICO MARGINAL⁺, células caliciformes presente, PAS⁺. Coloração adicional com Hematoxilina de Harris; aumento 100x.

FOTO 5 - CICO MARGINAL⁻, poucas células caliciformes, PAS⁺. Coloração adicional com Hematoxilina de Harris; aumento 200x.

FOTO 6 - CICO ANORMAL, ausência de células caliciformes, PAS⁻, células epiteliais dissociadas com núcleo picnótico. Coloração com hematoxilina de Harris; aumento 200x.

Na Tabela 23 encontra-se a distribuição das células caliciformes em cada classe, e as alterações morfológicas observadas em cada uma delas.

TABELA 23 - Distribuição de células caliciformes e alterações do epitélio da conjuntiva ocular.

CLASSES	CÉLULAS CALICIFORMES	CÉLULAS EPITELIAIS
Normal	Abundantes (≥ 15)	Numerosas, aparência normal formando área contínua de epitélio pavimentoso simples.
Marginal ⁺	Algumas (10-15)	Numerosas, aparência normal, redução da disposição celular como epitélio, podendo ocorrer tendência à separação ou achatamento celular.
Marginal ⁻	Poucas (5-10)	Numerosas, aparência normal em algumas, outras tendendo à separação, células alargadas (escamosas).
Anormal	Raras ou Ausente (< 5)	Alargadas e separadas (escamosas), relação entre o núcleo e o citoplasma alterada, núcleo picnótico

Para avaliação dos resultados da CICO utilizou-se como "padrão-ouro" as dosagens de retinol no soro. Embora este método bioquímico não seja o mais adequado, é o que melhor atende aos requisitos de aplicabilidade em pesquisas com crianças em nível de campo. É válido acrescentar que os valores séricos de retinol podem ser preditivos do estado de deficiência em vitamina A em populações expostas a fatores adversos (ecológicos e sócio-econômicos) que predisõem ao surgimento de desnutrição, infecção, suprimento inadequado de alimentos-fonte de vitamina A e pobreza (RANKINS *et al.*, 1993).

Na classificação dos estados normal ou anormal pelas dosagens de retinol no soro, utilizou-se o critério proposto pelo ICNND (1963), ou seja, para a categoria normal considerou-se valores iguais ou superiores a 20µg/dl ($\geq 0,70\mu\text{mol/L}$) e para a categoria anormal os valores inferiores a 10µg/dl ($< 0,35\mu\text{mol/L}$).

Estabelecidos os procedimentos citados acima procedeu-se à comparação entre a CICO e as dosagens séricas de retinol em 113 amostras.

Primeiramente, comparou-se a CICO com as dosagens de retinol no soro utilizando-se o ponto de corte de cinco células caliciformes. A Tabela 24 apresenta a distribuição das crianças na categoria normal/anormal em função dos níveis de retinol no soro (normal/deficiente).

A sensibilidade foi expressa como a probabilidade do teste ser positivo quando os níveis de retinol estiverem abaixo de $0,70\mu\text{mol/L}$, e a especificidade como a probabilidade do teste ser negativo quando os níveis de retinol estiverem acima de $0,70\mu\text{mol/L}$.

A sensibilidade da CICO foi baixa (21,1%) enquanto a especificidade foi alta (98,9%), sugerindo que dentro dos critérios empregados na comparação dos métodos, a CICO não é um bom preditor da deficiência de vitamina A, pois é pobre na detecção de casos de deficiência leve (Tabela 24).

TABELA 24 - Distribuição das crianças segundo os resultados da CICO e níveis de retinol no soro, utilizando o ponto de corte de cinco células caliciformes. Campinas, SP, 1991/1992.

DIAGNÓSTICO CICO	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)		TOTAL
	< 0,70	$\geq$ 0,70	
Normal (≥ 5)	4	1	5
Anormal (< 5)	15	93	108
TOTAL	19	94	113

Sensibilidade: $4/19 = 21,2\%$

Especificidade: $93/94 = 98,9\%$

$p = 0,0005$ (Teste de McNemar)

Comparando-se os valores médios dos níveis de retinol sérico na Tabela 25, constatou-se que o valor $0,98 \pm 0,03 \mu\text{g/dl}$, encontrado para o grupo normal (≥ 5 células caliciformes) diferiu significativamente ($p=0,013$) do grupo anormal (< 5 células caliciformes) cujos valores foram $0,65 \pm 0,14 \mu\text{g/dl}$. A mediana para o grupo normal foi 0,95 e para o anormal $0,52 \mu\text{mol/L}$ (Tabela 26).

TABELA 25 - Comparação dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) em função dos resultados da CICO.

CICO	MÉDIA	ERRO PADRÃO	COEFICIENTE VARIAÇÃO	N
Normal (≥ 5)	0,9783	0,027	29,1	108
Anormal (< 5)	0,6480	0,137	47,1	5

$p = 0,013$ (Teste t de Student)

Na comparação da CICO com os níveis médios de retinol no soro, utilizando-se outros pontos de corte para as células caliciformes, primeiramente, montou-se várias combinações dentro de cada classe, a fim de se obter dois estágios (Tabelas 26 e 27). Quando se compara a média do retinol nas diversas classes da CICO, as diferenças foram estatisticamente significativas até o limiar de dez células; ou seja, houve diferença nos níveis médios de retinol entre os grupos da classe 1 e da classe 2. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos da classe 3 (Tabela 27).

TABELA 26 - Variação da média e mediana dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) de 113 crianças, em função de vários pontos de corte da CICO.

CICO	MÉDIA	ERRO PADRÃO	COEFICIENTE VARIAÇÃO	MEDIANA	N	p*
<5	0,6480	0,137	47,1	0,520	5	0,013
≥ 5	0,9783	0,027	29,1	0,945	108	
<6	0,7313	0,098	37,9	0,610	8	0,019
≥ 6	0,9814	0,018	29,4	0,940	105	
<7	0,7200	0,087	36,3	0,630	9	0,009
≥ 7	0,9848	0,028	29,1	0,945	104	
<8	0,8308	0,084	36,5	0,950	13	0,082
≥ 8	0,9810	0,029	29,5	0,935	100	
<9	0,8390	0,064	34,3	0,850	20	0,035
≥ 9	0,9905	0,030	29,1	0,930	93	
<10	0,8333	0,061	33,7	0,750	21	0,023
≥ 10	0,9935	0,030	29,1	0,935	92	
<11	0,9077	0,042	29,2	0,930	39	0,140
≥ 11	0,9932	0,035	30,6	0,935	74	
<12	0,9077	0,042	29,2	0,930	39	0,140
≥ 12	0,9932	0,035	30,6	0,935	74	
<13	0,9084	0,039	28,5	0,930	45	0,103
≥ 13	1,0003	0,038	30,9	0,955	68	
<14	0,9084	0,039	28,5	0,930	45	0,103
≥ 14	1,0003	0,038	30,9	0,955	68	
<15	0,9110	0,037	28,0	0,910	48	0,100
≥ 15	1,0026	0,039	31,3	0,970	65	
TOTAL	0,9670	0,026	28,6	0,930	113	

* Teste t de Student

TABELA 27 - Variação das médias dos níveis de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) de 113 crianças em função das diversas classes da CICO.

CLASSES	MÉDIA	ERRO PADRÃO	COEFICIENTE VARIAÇÃO	MEDIANA	N	p*
CLASSE 1: Normal, Marg ⁺ , Marg ⁻ (≥ 5)	0,9783	0,027	29,1	0,945	108	0,013
Anormal (< 5)	0,6480	0,137	47,1	0,520	5	
CLASSE 2: Normal, Marg ⁺ (≥ 10)	0,9935	0,030	29,1	0,935	92	0,023
Marg ⁻ , Anormal (< 10)	0,8333	0,061	33,7	0,750	21	
CLASSE 3: Normal (≥ 15)	1,0026	0,039	31,3	0,970	65	0,100
Marg ⁺ , Marg ⁻ , Anormal (< 15)	0,9110	0,037	28,0	0,910	48	

*Teste t de Student

A sensibilidade, especificidade e os valores médios dos níveis de retinol no soro em função dos pontos de corte sugerido para as células caliciformes foram estudadas dentro de cada combinação. Verificou-se que mudando-se o ponto de corte de cinco para dez células caliciformes a sensibilidade passa de 21,1% para 47,4 % e a especificidade de 98,9% a 87,2% (Tabelas 28 e 29). Há aumento significativo na sensibilidade sem detrimento apreciável da especificidade, o que é desejável em testes de triagem.

TABELA 28 - Sensibilidade e especificidade segundo diversos pontos de cortes da CICO comparados com os níveis de retinol no soro de 113 crianças.

CICO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
< 4/≥ 4	21,1 (IC = 2,75-39,45)	98,9 (IC = 96,79-100,00)
< 5/≥ 5	21,2 (IC = 2,75-39,45)	98,9 (IC = 96,79-100,00)
< 6/≥ 6	26,3 (IC = 6,50-46,10)	96,8 (IC = 93,24-100,00)
< 7/≥ 7	31,6 (IC = 10,69-52,51)	96,8 (IC = 93,24-100,00)
< 8/≥ 8	31,6 (IC = 10,69-52,51)	92,6 (IC = 87,31 - 87,89)
< 9/≥ 9	47,4 (IC = 24,95-68,85)	88,3 (IC = 81,80 - 94,80)
<10/≥10	47,4 (IC = 24,95-69,85)	87,2 (IC = 80,45 - 93,95)
<11/≥11	52,6 (IC = 30,15-75,05)	69,1 (IC = 59,76 - 78,44)

TABELA 29 - Sensibilidade e especificidade das diversas classes de CICO segundo os níveis de retinol no soro de 113 crianças.

CLASSES CICO	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)		SENSIBILIDADE/ ESPECIFICIDADE
	< 0,70	$\geq 0,70$	
CLASSE 1:			
Normal, Marg ⁺ , Marg ⁻ (≥ 5)	15	93	21,2
Anormal (<5)	4	1	98,9
CLASSE 2:			
Normal, Marg ⁺ , (≥ 10)	10	82	47,4
Marg ⁻ Anormal (<10)	9	12	87,2
CLASSE 3:			
Normal (≥ 15)	8	57	57,9
Marg ⁺ Marg ⁻ , Anormal	11	37	60,6

Estes resultados demonstram haver associação direta entre os níveis séricos de retinol e o número de células caliciformes da conjuntiva ocular. A análise de regressão demonstrou a correlação existente entre os dois métodos (Tabela 30). Como variável dependente, considerou-se o nível de retinol, e como variável independente o número de células caliciformes. A correlação entre os resultados da CICO e as dosagens de retinol é estatisticamente significativa ($p=0,02$).

TABELA 30 - Correlação dos resultados da CICO com os níveis de retinol no soro de 113 crianças.

MODELO	p	CORRELAÇÃO
$\text{Retinol} = 0,809181 + 0,010419 * \text{CICO}$	0,0235	0,2130

Por outro lado, quando utilizou-se o critério de cinco células caliciformes para separar os casos normais dos anormais, a associação entre os dois métodos desaparece. Pelo teste de McNemar (SIEGEL, 1975), o método da CICO foi diferente do método de dosagens de retinol no soro, e esta diferença foi significativa estatisticamente ($p=0,0005$), indicando que o limiar de cinco células caliciformes parece ser inadequado para a classificação dos sujeitos em normal e anormal (Tabela 24).

Os dados da literatura sobre a comparação dos métodos são discordantes em valores de sensibilidade, especificidade e média dos níveis de retinol; entretanto, é surpreendente o fato de ninguém discutir a validade do ponto de corte arbitrariamente adotado para classificação pela CICO.

NATADISASTRA *et al.* (1987) relataram em pré-escolares, da Indonésia, médias de $0,78\mu\text{mol/L}$ ($22\mu\text{g/dl}$) de retinol no grupo classificado como normal pela CICO e $0,56\mu\text{mol/L}$ ($16\mu\text{d/dl}$) para o classificado como anormal. Em 1988, os mesmos Autores

confirmaram que todas as crianças diagnosticadas como anormais pela CICO tinham níveis sanguíneos de retinol inferiores a 10µg/dL, demonstrando sensibilidade de 93% e especificidade de 94%.

GADOMSKI *et al.* (1989), trabalhando com limiar de 0,70µmol/L para o retinol, encontraram sensibilidade de 26%, semelhante à encontrada neste trabalho, e especificidade de 81%, não observando diferenças significativas nos níveis séricos de retinol entre os dois grupos (normal/anormal).

CARLIER *et al.* (1991b), analisando um grupo de pré-escolares no Senegal, demonstraram que a CICO variou em sensibilidade e especificidade segundo o critério citológico utilizado. O teste melhorou a sensibilidade para 53,9% quando considerou apenas dois grupos: a = marginal⁺, marginal⁻, deficiente, e b = normal; isto em relação à sensibilidade de 14,3% considerando os grupos: a = normal, marginal⁺, marginal⁻, e b = deficiente. Valores baixos em sensibilidade e altos em especificidade foram obtidos pelos Autores mesmo quando a comparação foi feita utilizando-se o limiar de 0,35µmol/L para os níveis de retinol no soro.

KHAN *et al.* (1992) compararam os resultados da CICO e do Rosa Bengala com os níveis de retinol no soro. A sensibilidade da CICO foi 80%, enquanto a do Rosa Bengala foi 53,3%, entretanto, a sensibilidade aumentou para 100% quando foi usado o valor de retinol de 0,35µmol/L como ponto de corte.

Na tentativa de padronizar a CICO, o grupo de CARLIER *et al.* (1992) através de dois levantamentos conduzidos com crianças na área rural do Senegal, propuseram a utilização de dois estágios: normal e anormal para aplicação da CICO, em virtude da dificuldade em controlar as variações ocorridas nas interpretações entre observadores. Encontraram para o critério proposto, 74% de sensibilidade e 48% de especificidade.

Percebe-se que muitos trabalhos foram conduzidos para avaliar a confiabilidade e a validade da CICO. Todos discutem a necessidade de padronizar a metodologia, sendo que as mais recentes pesquisas evidenciam cada vez mais a necessidade da utilização de dois critérios no diagnóstico definitivo. Entretanto, não é discutida a forma de quantificação das células caliciformes, instrumento principal utilizado na separação das classes normais e anormais.

Encontramos nesta pesquisa, diferenças estatisticamente significativas nos níveis de retinol no soro e obtivemos melhora considerável na sensibilidade, com valores ainda altos de especificidade, utilizando o limiar de dez células caliciformes. Embora tenha-se trabalhado com pequeno número de casos anormais (n=6) encontramos muitos casos acima de cinco células caliciformes, e que também apresentavam alterações morfológicas epiteliais. Aparentemente, utilizar apenas um ponto de corte é simplificar demais a metodologia, de forma que sugerimos usar mais um ponto de corte entre as classes normal e anormal.

Alguns autores têm discutido os fatores que contribuem para a redução na sensibilidade da CICO. Certas doenças oftalmológicas (tracoma e conjuntivite) são consideradas mascaradoras dos resultados da CICO, resultando em aumento do número de falsos negativos, visto que a inflamação ocasionada por tracoma (*Chlamydia trachomatis*) aumenta a vascularização da conjuntiva, e indiretamente estimula a produção de muco (NATADISASTRA *et al.*, 1988; CARLIER *et al.*, 1989; CARLIER *et al.*, 1991b; CARLIER *et al.*, 1992). Por outro lado, o tracoma ou irritações no olho provocadas pela fumaça de cigarro ou poeiras podem ocasionar resultados falsos positivos (DETECTING..., 1992).

No caso específico da conjuntivite, CARLIER *et al.* (1991a) não encontraram influência significativa nos resultados da CICO. O mesmo aconteceu com relação ao tracoma onde o diagnóstico da CICO foi semelhante em crianças com e sem tracoma. A sensibilidade, nestes casos, foi mais baixa quando as crianças portadoras da infecção foram excluídas (54% para 48%), demonstrando a baixa capacidade do CICO em identificar os verdadeiros positivos (CARLIER *et al.*, 1991a; CARLIER *et al.*, 1991b).

Com relação às fontes de erro introduzidas pelo método de dosagem da vitamina, são várias também as argumentações. Por exemplo, comparar os resultados da CICO com apenas uma medida dos níveis de retinol no soro foi questionada. Os níveis de retinol são facilmente alterados e podem subestimar a validade do teste (SOMMER citado por CARLIER *et al.* 1992).

Em 1990, SAMBA *et al.*, demonstraram grande número de falsos negativos em crianças com malária, sarampo e diarreia. A infecção mesmo que assintomática pode ser fator condicionante na diminuição dos níveis sanguíneos de retinol (NATHANAIL &

POWERS, 1992). Também tem sido sugerido que infecção viral pode levar à depleção do retinol hepático, mesmo quando as reservas são inadequadas (DEKKERS citado por RAO *et al.*, 1987).

Alguns autores têm postulado que os níveis sanguíneos de retinol podem ainda ser alterados durante o transporte e armazenamento das amostras, levando a erros (GADOMSKI *et al.*, 1989). Apesar das precauções e cuidados em todas as etapas é possível haver perdas de retinol entre o período transcorrido na coleta até análise (MILLER *et al.*, 1984).

Apesar de todas estas questões polêmicas sobre os falsos negativos da CICO e os falsos positivos da dosagem de retinol, acreditamos que a quantidade de cinco células caliciformes, padronizada para diferenciar os grupos normal e anormal deva ser melhor avaliada.

É relevante ressaltar que na realização deste estudo, os fatores de tendenciosidade foram eliminados pela: 1ª) ausência de infecções oculares na amostra; 2ª) seleção aleatória das crianças a serem testadas pelos dois métodos; 3ª) reprodutibilidade das observações da CICO em diferentes tempos; e 4ª) pelo controle criterioso de todas as etapas da análise do retinol, inclusive do armazenamento realizado em temperaturas recomendadas (CRAFT *et al.*, 1988; DRISKELL *et al.*, 1985a; DRISKELL *et al.* 1985b).

5.6. Suplementação

Para confirmar os casos positivos diagnosticados pela CICO, as crianças receberam cápsula de vitamina A (200.000 UI), e foram reexaminadas 30 dias após. Das 5 crianças suplementadas, foi possível reavaliar 4 pela CICO e pelas dosagens de retinol no soro. Um caso foi perdido por falta de localização da criança.

Houve reaparecimento das células caliciformes nos dois olhos em 2 casos (50%), em um olho em um caso e nenhuma recuperação no caso restante.

Com relação aos níveis de retinol no soro houve pequeno aumento em todos os casos em que se evidenciou regressão das células caliciformes. Por outro lado, na

criança que não mostrou reação à suplementação, os níveis de retinol eram altos ($1,1\mu\text{mol/L}$) antes e depois do tratamento ($0,87\mu\text{mol/L}$), o que sugere a interferência de algum fator externo (Tabela 31).

TABELA 31 - Níveis médios de retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) antes e após a suplementação (200.000 UI acetato de retinila).

NÚMERO DA CRIANÇA	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)	
	ANTES	APÓS
91	0,48	0,56
97	0,52	0,67
172	1,19	0,87
220	-	0,63
226	0,48	-

O uso de doses de vitamina A na recuperação de células caliciformes tem sido descrita por outros autores. REDDY *et al.* (1989) relataram melhoria no resultado citológico e aumento dos níveis de retinol no soro em quase todas as crianças examinadas pela CICO.

O mesmo resultado foi verificado por NATADISASTRA *et al.* (1987). A recuperação das crianças após tratamento com vitamina A ocorreu no período de 2 semanas a 6 meses, conforme demonstrado pelo retorno das células caliciformes.

SOMMER *et al.* (1981a), em minucioso estudo sobre a resposta terapêutica em crianças com deficiência de vitamina A, observaram retorno gradual de caliciformes, variando de 7 dias a 2 meses, com aparecimento primeiro no quadrante nasal e posteriormente no temporal.

Nossos resultados, associados aos da literatura, permitem reforçar a especificidade da CICO. Apesar da baixa sensibilidade apresentada pelo método para diagnosticar deficiência leve ou moderada. Até o momento não há métodos mais práticos e aceitáveis pela criança do que a CICO para avaliar a deficiência de vitamina A em pesquisas de campo.

5.7. Vantagens e desvantagens da CICO

A CICO surgiu da necessidade de um método factível para o diagnóstico precoce da hipovitaminose A em nível populacional em países em desenvolvimento.

As vantagens da CICO em relação aos métodos tradicionais são mencionadas com certa euforia pela grande maioria dos autores. Dentre as numerosas vantagens destacam-se: pouco invasivo, muito simples, objetivo, rápido, mais barato, facilidade de execução no campo e em todas as etapas de manuseio e laboratoriais. Diante de todas essas vantagens, a identificação de casos de hipovitaminose A em países onde o problema é grave, por uma técnica facilmente aplicável se torna interessante. Entretanto, mesmo reconhecendo toda a potencial vantagem da CICO, nossa experiência demonstra que sua aplicação é limitada em alguns casos, os quais devem também ser mencionados.

O sucesso da técnica depende fundamentalmente da cooperação do indivíduo, o que é extremamente difícil em pré-escolares. Outros fatores, já mencionados nos itens 5.4.3.2. e 5.4.3.3 também afetam drasticamente a qualidade das amostras. Algumas vezes, o papel de celulose se quebra dentro do olho, o que pode alarmar a criança. Nesses casos é necessário uma atitude que transmita carinho e confiança para resolver o inconveniente. É evidente, que nestes casos, o exame fica interrompido porque a criança não mais aceita a repetição, e aquelas que presenciam o acontecimento rejeitam se submeter ao exame.

Afora estas considerações, os problemas seguintes são relacionados ao processo de coloração e interpretação das leituras microscópicas. Estes, principalmente os relacionados com o procedimento de coloração são facilmente contornáveis. As dificuldades apresentadas pela leitura ao microscópio sob as alterações do epitélio, por sua vez, podem ser aprimoradas pelo treinamento e através de padronização.

Os estudos publicados que utilizam a CICO ainda são poucos, e se referem a algumas populações e regiões fora do Brasil. Os métodos tradicionalmente disponíveis (clínicos, funcionais e bioquímicos) tem aplicação limitada em nível de população. Portanto a CICO, ainda método não ideal, é viável e poderia ser mais utilizada em campo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem concluir:

- A avaliação do estado de vitamina A pela CICO apresentou prevalência de hipovitaminose A em apenas 2,0%, enquanto as dosagens de retinol no soro detectaram prevalência de 17,6%, com níveis de retinol entre 0,35 a 0,70 mmol/L.

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis médios de retinol quando as crianças foram agrupadas por sexo ou por idade. De igual forma, não foi possível afirmar que os casos de deficiência de vitamina A estivessem concentrados em quaisquer dos grupos de sexo ou idade.

- As crianças têm o hábito de consumir pelo menos uma vez por mês alguma fruta ou verdura fonte de vitamina A.

- Apesar do levantamento da frequência alimentar ter se apresentado adequado para metade das crianças (50,7%), a outra metade (49,3%) encontra na categoria de risco nutricional médio e alto.

- Pelo exame clínico ocular sob luz ambiente não foi encontrado alteração sugestiva da deficiência de vitamina A e, também não foi diagnosticado nenhum caso de cegueira ou xeroftalmia grave pelo exame oftalmológico (biomicroscopia e fundo de olho).

- O método de BIERI *et al.* (1979), escolhido para a dosagem de retinol no soro, apresentou recuperação, média, de 89,8%, com uma variação de 71 a 103%.

- A rejeição ao método da CICO foi maior entre os pré-scolares (10,7%). Houve tendência de resultados falsos positivos pela CICO, e a coleta foi considerada como o passo mais crítico para um bom diagnóstico.

- Houve concordância entre a leitura microscópica direta no papel de celulose em relação à leitura da impressão sobre a lâmina em 95% dos casos, mas em 26,2% das amostras não houve transferência das células do papel para a lâmina.

- O método da leitura da impressão sobre lâmina foi mais simples, mas foi necessário confirmar casos positivos pela leitura direta no papel.

- A sensibilidade da CICO foi baixa (21,2%) e especificidade alta (98,9%), em relação aos níveis séricos de retinol (0,35 a 0,70 mmol/L).

- A sensibilidade melhorou significativamente, sem detrimento considerável da especificidade, mudando-se o ponto de corte da CICO de cinco para até dez células caliciformes.

- A CICO possui viabilidade para pesquisas de triagem no País e poderia ser mais utilizada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. ALMEIDA, L. B. & PENTEADO, M. V. C. Carotenóides com atividade pró-vitáminica A de cenouras (*Daucus carota* L.) comercializadas em São Paulo. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo.** 23: 133-141, 1987.
002. ANÇÃO, M. S.; CUPPARI, L.; TUDISCO, E. S.; DRAIBE, S. A.; SIGULEM, D. Sistema de apoio a decisão em nutrição: Versão 1.0. São Paulo, Centro de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina, s.d.
003. AMÉDÉE-MANESME, O.; ANDERSON, D.; OLSON, J. A. Relation of the relative dose response to liver concentrations of vitamin A in generally well nourished surgical patients. **Am. J. Clin. Nutr.** 39:898-902, 1984.
004. AMÉDÉE-MANESME, O.; LUZEAU, R.; CARLIER, C.; ELLRODTH, A. Simple impression cytology method for detecting vitamin A deficiency. **Lancet.** 30(5):1263, 1987.
005. AMÉDÉE-MANESME, O.; LUZEAU, R.; WITTEPEN, J. R.; HANCK, A.; SOMMER, A. Impression cytology detects subclinical vitamin A deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.** 47(5):875-878, 1988.
006. AMÉDÉE-MANESME, O. & De MAEYER, E. **Le déficit en vitamin A strategies diagnostiques et therapeutiques.** Paris, INSERM-ORSTOM, 1989. 63 p.
007. ANDERSON, R. K. & MILAN, D. F. Biomicroscopy of the eyes in evaluation on nutritional status conjunctival changes. **J. Nutr.** 30(1):10-17, 1945.
008. ARAÚJO, K. L.; DINIZ, A. S.; SANTOS, L. M. P. Diagnóstico e evolução de casos de ceratomalácia e xeroftalmia. **J. Pediatr.** 57(516):419-424, 1984.

009. ARAÚJO, R. L.; ARAÚJO, M. B. D. G.; SIEIRO, R. O. ; MACHADO, R. D. P.; LEITE, B. V. Diagnóstico de hipovitaminose A e anemia nutricional. Estudo realizado na população do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. **Rev. Bras. Med.** 43(8):225-228, 1986.
010. ARAÚJO, R. L. **Situação alimentar e nutricional no Brasil.** Brasília, 1989. 132p.
011. ARMITAGE, P. & BERRY, G. **Statistical methods in medical research.** Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987. 559 p.
012. ARRIMA, H. K. Composição de carotenóides de cucurbitáceas brasileiras. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. Campinas, 1987. 186 p. (Tese de Mestrado)
013. ARRIMA, H. K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. **J. Micronutr. Anal.** 4:177-191, 1988.
014. ARROYAVE, G. & CALCANO, M. Descenso de los niveles sericos de retinol y de su proteína de enlace (RBP) durante las infecciones. **Arch. Latinoam. Nutr.** 29:233-260, 1979.
015. ARROYAYE, G.; CHICHESTER, C. O.; FLORES, H.; GLOVER, J. G.; MEJIA, L. A.; OLSON, J. A.; SIMPSON, K. L.; UNDERWOOD, B. **Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status.** Washington, IVACG, 1981. 88 p.
016. BARROS, A. A.; BARROS, M. B. A.; MAUDE, B. H.; ROSS, D. A.; DAVIES, P. S. W.; PREECEM, A. Evaluation of the nutritional status of 1st-year school children in Campinas, Brasil. **Ann. Trop. Pediatr.** 10:75-84, 1990.
017. BATISTA, M. Considerações sobre o problema de vitamina A no Nordeste brasileiro. **O Hospital.** 75(3):817-32, 1969.
018. BATISTA FILHO, M. & CARTAGENA, H. G. Epidemiologia das principais endemias carenciais no Brasil. In: CNPq/SEPLAN. **Prioridades de pesquisas aplicadas ao planejamento em nutrição e alimentação.** Brasília, 1985. p. 87-132.

019. BATISTA FILHO, M. Produção e consumo de fontes alimentares de vitamin A no Brasil; documento apresentado no seminário sobre prevenção e controle da deficiência de vitamina A no Brasil. Brasília, INAN, 1989.
020. BAUERNFEIND, J. C. **Vitamin A deficiency and its control**. Orlando, Academic Press, 1986. 67p.
021. BEDO, G.; SANTISTEBAN, P.; ARANDA, P. Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. **Nature**. 339:231-234, 1989.
022. BENDICH, A. Carotenoids an the immune response. **J. Nutr.** 119(1):112-115, 1989.
023. BENDICH, A. & LANGSETH, L. Safety of vitamin A. **Am. J. Clin. Nutr.** 49(2):358-371, 1989.
024. BERGEN, H. R.; NATADISASTRA, G.; MUHILAL, H.; DEDI, A.; KARYADI, D.; OLSON, J. A. Vitamin A and vitamin E status of rural preschool children in West Java, Indonésia, and their response to oral dose of vitamin A and of vitamin A. **Am. J. Clin. Nutr.** 48(2):279-285, 1988.
025. BESNER, J. G. & LECLAIRE, R. High-performance liquid chromatography of 13-cis-retinoic acid and of endogenous in human plasma. **J. Chromat.** 183:346-351, 1980.
026. BIERI, J. G.; TOLLIVER, T.J.; CATIGNANI, G. L. Simultaneous determination of alfa-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. **Am. J. Clin. Nutr.** 32:2143-2149, 1979.
027. BLACKFAN, K. D. & WOLBACH, S. B. Vitamin A deficiency in infants, clinical and pathological study. **J. Pediatr.** 3:679, 1933.
028. BLOEM, M. W.; WEDEL, M.; EGGER, R. J.; SPEEK, A. J.; CHUSILP, K.; SAOWAKONTHA, S.; SCHREURS, W. H. P. A prevalence study of vitamin A deficiency and xerophthalmia in Northeastern Thailand. **Am. J. Epidemiolog.** 129(6):1095-1103, 1989.
029. BLOEM, M. W.; WEDEL, M.; AGTMAAL, E. J. V.; SPEEK, A. J.; SAOWAKONTHA, S.; SCHREURS, W. H. P. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.** 51(1):76-79, 1990a.

030. BLOEM, M. W.; WEDEL, M.; EGGER, R. J.; SPEEK, A. J.; SCHRIJVER, J.; SAOWARONTHA, S.; SCHREURS, W. H. P. Mild vitamin A deficiency and risk of respiratory tract diseases and diarrhea in preschool and school children in Northeastern Thailand. *Am. J. Epidemiolog.* **131**(2):332-339, 1990b.
031. BLOMHOFF, R.; BERGS, T.; NORUM, K. Distribution of retinol in rat liver cells: effect of age, sex and nutritional status. *Brit J. Nutr.* **60**(2):233-239, 1988.
032. BLOMHOFF, R.; GREEN, M. H.; GREEN, J. B.; BERG, T.; NORUM, K. R. Vitamin A metabolism: new perspective on absorption, transport, and storage. *Physiol. Rev.* **71**(4):951-990, 1991.
033. BONDI, A. & SKLAN, D. Vitamin A and carotene in animal nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.* **8**:165-191, 1984.
034. BOOT, S. L.; JOHS, T.; KUHNLEIN, H. V. Natural food sources of vitamin A and provitamin A. *Food Nutr. Bull.* **14**(1):6-19, 1992.
035. BRINK, E. W.; PEREIRA, W. D. A.; BROSKE, S. P.; CASH, R. A.; SMITH, J. L.; SAUBERLICH, H. E.; BASHOR, M. M. Vitamin A status of children in Sri Lanka. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**:84-91, 1979.
036. CAMPINAS. Prefeitura Municipal. Secretaria de Planejamento. **População:** Região de Campinas, 1993. p. 3, 9, 35 e 37. (Seminário de dados, n. 1)
037. CAMPOS, F. A. C. S.; FLORES, H.; UNDERWOOD, B. A. Effect of an infection on vitamin A status of children as measured by the relative dose response (RDR). *Am. J. Clin. Nutr.* **46**:91-94, 1987.
038. CARLIER, C.; MOUREY, M. S.; LUZEAU, R.; ELLRODT, A.; LEMMONIER, D.; AMÉDÉE-MANESME, O. Assessment of vitamin A status in an elderly French population using impression cytology with transfer. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **59**(1):3-7, 1989.
039. CARLIER, C.; MOULIA-PFIAT, J. P.; CECCON, J. E.; N'DIAYE, M.; RESNKOFF, S.; AMÉDÉE-MANESME, O. Protein energy malnutrition and vitamin A deficiency in Senegalese pre-school children. *Int. J. Nutr. Res.* **60**(2):209, 1990.
040. CARLIER, C.; MOULI-PELAT, J. P.; CECCON, J. E.; MOUREY, M. S.; FALL, M. F.; N'DIAYE, M.; AMÉDÉE-MANESME, O. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Dioubel, Fatich, and Kaolack regions of Senegal: a controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**(1):74-77, 1991a.

041. CARLIER, C.; MOULIA-PELAT, J. P.; CECCON, J. F.; MOUREY, M. S.; FALL, M.; N'DIAYE, M.; AMÉDÉE-MANESME, O. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Dioubel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: feasibility of the method of impression cytology with transfer. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1):66-69, 1991b.
042. CARLIER, C.; MOULIAT-PELAT, J. P.; CECCON, J. F.; MOUREY, M. S.; AMELINE, B.; FALL, M.; N'DIAYE, M.; AMÉDÉE-MANESME, O. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Dioubel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: epidemiology study. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1):70-73, 1991c.
043. CARLIER, C.; COSTE, J.; ETCHEPARE, M.; AMÉDÉE-MANESME, O. Conjunctival impression cytology with transfer as a field-applicable indicator of vitamin A status for mass screening. *Int. J. Epidemiolog.* 21(2):373-380, 1992.
044. CHAROENKIATKUL, S.; VALYASEVI, A.; TONTISIRIN, K. Dietary approaches to the prevention of vitamin A deficiency. *Food Nutr. Bull.* 7:72-86, 1985.
045. COCHRAN, W. G. *Sampling techniques*. 3.ed. New York. John Wiley, 1977. 428 p.
046. COHEN, N.; RAHMAN, H.; SPRAGUE, J.; JALIL, M. A.; REGT, E.L.; MITRA, M. Prevalence and determinants of nutritional blindness in Bangladesh children. *World Health Stat. Q.* 38:317-29, 1985.
047. COHEN, N.; RAHMAN, H.; MITRA, M.; SPRAGUE, J.; ISLAM, S.; REGT, L. E. Impact of massive doses of vitamin A on nutritional blindness in Bangladesh. *Am. J. Clin. Nutr.* 45(5):970-976, 1987. 1987.
048. COLLISON, E. C. Consideration of the adequacy of biomicroscopy as a method of detecting mild cases of vitamin A deficiency. *Science.* 95:250, 1942.
049. CONDE, H. B. Evolução da oculística no Brasil. *Hora Méd.* 7:27-38, 1939.
050. CONTENTE, J. J. S. Estudo clínico-nutricional em menores da cidade de Manaus. *Rev. Ass. Méd. Bras.* 9:169-180, 1963.
051. COSTA, A. *Contribuição ao estudo do diagnóstico da carência vitamínica A na criança*. Rio de Janeiro, 1953a. 202 p. Tese (Livre Docência)

052. COSTA, A. O valor da concentração sanguínea de vitamina A como índice de carência. **Bol. Inst. Puer.** 8(16):39-51, 1953b.
053. COSTA, A. & GAMA, J. Contribuição estudo das alterações ósseas da carência vitamínica na infância. **O Hospital.** 44(5):65-100, 1953.
054. COSTELO, A. M. L. Vitamin A supplementation and childhood. **Lancet.** 1: 161, 1986.
055. COUTSOUDIS, A.; BROUGHTON, M.; COOVADIA, H. M. Vitamin A supplementation reduces measles morbidity in young African children: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Am. J. Clin. Nutr.** 54(5):890-895, 1991.
056. CRAFT, N. E.; BROWN, E. D.; SMITH, J. C. Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids, retinol, and tocopherol in plasma. **Clin. Chem.** 34(1):44-48, 1988.
057. DALLMAN, P. R. Iron deficiency and related nutritional anemias. In: NATHAN, D. G. & OSKI, F. A. eds. **Hematology: of infancy and childhood.** 3. ed. Philadelphia, W. B. Saunders. 1987. p. 274-314.
058. D'ANS, C. D.; DRICOT, J.; DINIZ, A. S.; MARIATH, J. G. S.; SANTOS, L. M. P. Geographic distribution of xerophthalmia in the state of Paraíba, Northeast Brazil. **Ecol. Food. Nutr.** 22:131-138, 1988.
059. DeLUCA, L. M. The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. **Vitam. Horm.** 3:351-357, 1977.
060. DeLUCA, L.; GLOVER, J.; HELLER, J.; OLSON, J. A.; UNDERWOOD, B. **Recent advances in the metabolism and function of vitamin A and their relationship to applied nutrition;** a Report International Vitamin A Consultive Group. Washington, IVACG, 1979. 44 p.
061. DETECTING vitamin A deficiency early. **Lancet.** 339(8808):1514-1515, 1992.
062. DOREA, J. G.; SOUZA, J. A.; GALVÃO, M. O.; IUNES, M. M. F. Concentration of vitamin A in the liver of foetuses and infants dying of various causes in Brasília, Brazil. **Int. J. Nutr. Res.** 54:119-123, 1984.
063. DOWLING, J. E. & WALD, G. Vitamin A deficiency and night blindness. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 44:648-661, 1958.

064. DOWLING, J. E. Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature*. **188**(8): 114-118, 1960.
065. DRISKELL, W. J.; NEESE, J. W.; BRYANT, C. C.; BASHOR, M.M. Measurement of vitamin A and vitamin E in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* **231**(2):439-444, 1982.
066. DRISKELL, W. J.; BASHOR, M. M.; NEESE, J. W. Loss of vitamin A in long-term stored, frozen sera. *Clin. Chim. Acta*. **147**:25-30, 1985a.
067. DRISKELL, W. J.; LACKEY, A. D.; HEWETT, J. S.; BASHOR, M. M. Stability of vitamin A in frozen sera. *Clin. Chem.* **31**(6):871-872, 1985b.
068. EGBERT, P. R.; LAUBER, S.; MAURICE, D. M. A simple conjunctival biopsy. *Am. J. Ophthalmol.* **84**(4):798-801, 1977.
069. ESCOUTE, A. J.; CHIRAMBO, M. C.; LUZEAU, R.; AMÉDÉE-MANESME, O. Assessment of vitamin A deficiency in Republic of Malawi by impression cytology method. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.* **61**(1):10-16, 1991.
070. FAO. **Necessidades de energia y de proteínas; Informe de uma Reunião Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos.** Ginebra, 1985. 220 p. (Série Inf. Téc., n. 724)
071. FAO. **Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation.** 1988. p. 1-61 (FAO. Food and nutrition, n. 23)
072. FAVARO, R. M. D.; SOUZA, N. V. de.; BATISTAL, S. M.; FERRIANI, M. G. C.; DESAI, I. D.; OLIVEIRA, J. E. D. de. Vitamin A status of young children in Southern Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**(5):852-858, 1986a.
073. FAVARO, R. M. D.; SOUZA, N. V.; VANNUCCHI, H.; DESAI, I. D.; OLIVEIRA, J. E. D. Evaluation of rose bengal staining test and rapid dark-adaptation teste for the field assessment of vitamin A status of preschool children in Southern Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**(6):940-945, 1986b.
074. FERRANDO, R. From analysis to reability: bioavaibility in nutrition and toxicology - a misunderstood concept. *World Rev. Nutr. Diet.* **53**: 26-68, 1987.

075. FLORES, H. & ARAÚJO, C. R. C. Liver stores of vitamin A infants and preschool children deceased in Recife. In: Congresso Internacional de Nutrição, 1º Rio de Janeiro, 1978. p. 197.
076. FLORES, H.; CAMPOS, F.; ARAUJO, C. R. C.; UNDERWOOD, B. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**:1281-1289, 1984.
077. FLORES, H.; AZEVEDO, M. N. A.; CAMPOS, F. A. C. S.; BARRETO-LINS, M. C.; CAVALCANTI, A. A.; SALZANO, A. C.; VARELA, R. M.; UNDERWOOD, B. Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 y know to have adequate vitamin A status: a reference population. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:701-711, 1991.
078. FRANDSEN, H. Hemeralopia as early criterion of A-avitaminosis and clinical symptoms and treatment of this disease. *Acta. Ophthalmol.* **4**:1, 1935. (Supp)
079. FURR, H. C.; AMÉDÉ-MANESME, O.; CLIFFORD, A.; BERGEN, H. R.; JONES, A. D.; ANDERSON, D.; OLSON, J. Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally health adult humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**(4):713-716, 1989.
080. GADOMSKI, A. M.; KJOLHEDE, C. L.; WITTPENN, J.; BULUX; ROSAS, A. R. & FORMAN, M. R. Conjunctival impression cytology (CIC) to detect subclinical vitamin A deficiency: comparison of CIC with biochemical assessments. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**(3):495-500, 1989.
081. GANDRA, Y. R. Inquérito sobre o estado nutricional de um grupo da população da cidade de São Paulo. II-Investigações sobre a ocorrência de hipovitaminose A. *Arq. Fac. Hig. Saúde Pública.* **8**(2):217-260, 1954.
082. GARRETT-LASTER, M.; OAKS, M.; RUSSELL, R. M. A lowering effect of pharmacologic dose of vitamin E on serum vitamin A in normal adults. *Nutr. Res.* **1**:559-564, 1981.
083. GIUGLIANO, R.; ALBUQUERQUE, H. C. R.; SHRIMPTON, R. Estudo antropométrico, clínico e de padrões alimentares em um grupo de escolares de Manaus, 1976. *Acta Amazônica.* **8**(1):75-82, 1978a.
084. GIUGLIANO, R.; SHRIMPTON, R.; ARCOLL, D.; Diagnóstico da realidade alimentar e nutricional do Estado do Amazonas, 1978. *Acta Amazônica.* **8**(2):1-54, 1978b. (Suppl. 2)

085. GLOVER, J.; KERSHAN, R. C.; LARGE, S. Control of retinol transport in plasma. **World. Rev. Nutr. Diet.** 31:21-26, 1978.
086. GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. **Lebensm. Wiss. Technol.** 22:100-103, 1989.
087. GOLDBLATT, H. & BENISCHEK, M. Vitamin deficiency and metaplasia. **J. Exped. Med.** 46(5):699-707, 1927.
088. GOODMAN, D. S. Vitamin A and retinoids in health and disease. **New Engl. J. Med.** 310(4):1023-1031, 1984.
089. HATCHELL, D. L. & SOMMER, A. Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency. **Arch. Ophthalmol.** 102:1389-1393, 1984.
090. HENNING, A.; FOSTER, A.; SHRESTHA, S. P.; Vitamin A deficiency and corneal ulceration in South-east Nepal: implications for preventing blindness in children. **Bull. World Health Organ.** 69(2):235-239, 1991.
091. HENRY, J. B. **Clinical diagnosis and management: laboratory methods.** 17. ed. Philadelphia, W. B. Sanders, 1988.
092. HODGES, R. E.; SAUBERLICH, H. E.; CANHAM, J.E.; WALLACE, D. L.; RUCKER, R.B.; MEJIA, L. A.; MOHANRAM, M. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.** 31(5):876-885, 1978.
093. HORWITZ, A. El costo de la malnutrición. In: OPAS. Vigilancia alimentaria y nutricional en las Americas. OPAS. Washington, 1989. p. 19-54. (Publ. Cient., n. 516)
094. IBGE. **Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil: aspectos nutricionais de 1974-1975.** IBGE, Rio de Janeiro, 1982. p. 83-185.
095. ICEPO. **Training manual: assessment of vitamin A status by impression cytology.** Baltimore. Dana Center for Preventive Ophthalmology, The Johns Hopkins University. 1988. 25 p.
096. ICNND. (Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense). **Manual for Nutrition Surveys.** 2. ed. Washington, D. C. Government Printing Office, 1963.

097. ICNND. (Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense). **Northeast Brazil Nutrition Survey, March-May, 1963.** Washington, 1965.
098. INAN. (Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição). **Pesquisa Nacional sobre saúde e nutrição-PNSN, 1989: resultados preliminares,** Brasília, 1990.
099. IVACG. Development of a simplified approach to dietary assessment of vitamin A intakes. In: IVACG. **Guidelines for the development of a simplified dietary assessment to identify groups at risk for inadequate intake of vitamin A.** Washington, 1989. p. 7-36.
100. JEGHERS, H. Night blindness as a criterion of vitamin A deficiency: review of the literature with preliminary observations of the degree and prevalence of vitamin A deficiency among adults in both health and disease.. **Ann. Int. Med.** 10(9):1304-1334, 1937.
101. JORDAN, M. D. **Antropometric software package: tutorial guide and handbook.** Atlanta, Centers for Disease Control 1987. 53 p.
102. KEENUM, D. G.; SEMBA, R. D.; WIRASASMITA, S.; NATADISASTRA, G.; MUHILAL; WEST, K. P.; SOMMER, A. Assessment of vitamin A status by a disk applicator for conjunctival impression cytology. **Arch. Ophthalmol.** 108:1436-1441, 1990.
103. KESSING, S. V. Investigations of the conjunctival mucin. **Acta Ophthalmol.** 44(1):439-453, 1966.
104. KESSING, S. V. Topographical quantitative studies of the conjunctival goblet cells. **Acta Ophthalmol.** p. 36-50, 1968 (Supp. 95),
105. KHAMGAONKAR, M. B.; RAMKRISHNAN, S.; GHULIANI, K. K.; MURTHY, G. V. S.; NAYAR, S.; VIDWANS. Vitamin A intake and vitamin A deficiency in rural children. **Ind. Pediat.** 27(5):443-446, 1990.
106. KHAN, A. A.; HUDA, S.; AHMED, A. N.; HOSSAIN, T.; SULTANA, N.; ALI, S. M. K. Detection of early xerophthalmia by impression cytology and rose bengal staining - a comparative study. **Banglad. Med. Res. Counc. Bull.** 18(1):1-11, 1992.
107. KIMURA, M. Reavaliação de métodos analíticos e determinação da composição de carotenóides e valor de vitamina A em mamão e cajá. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas. 1989. 115 p.

108. KJØLHEDE, C. L.; GADOMSKI, A. M.; WITTPENN, J.; BULUX, J.; ROSAS, A. R.; SOLOMONS, N. W.; BROWN, K. H.; FORMAN, M. R. Conjunctival impression cytology, feasibility of a field trial to detect subclinical vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 49:490-494, 1989.
109. KNERT, P.; AROMA, A.; MAATELA, J.; AARAN, R. K.; NIKKARI, T.; HAKAMA, M.; HAKULINEN, T.; PETO, R.; TEPPÖ, L. Serum vitamin A and subsequent risk of cancer: cancer incidence follow-up of the finnish mobile clinic health examination survey. *Am. J. Epidemiol.* 132(5):857-870, 1990.
110. KRAFT, N. E.; BROWN, E. D.; JUNIOR SMITH, J. C. Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids, retinol, and tocopherol in plasma. *Clin. Chem.* 34(1):44-48, 1988.
111. KRUSE, H. D. Methods of detecting mild cases of vitamin A deficiency. *Science.* 95:623, 1942.
112. KUHNLEIN, H. V. Food sources of vitamin A and provitamin A. *Food Nutr. Bull,* 14(1):3-5, 1992.
113. KUSIN, J. A.; SINAGA, P. H. S. R.; MARPAUG, A. M. Xerophthalmia in North Sumatra. *Trop. Geogr. Med.* 29(1):41-46, 1977.
114. KUSIN, J. A.; SOEWONDO, W.; PARLIN, D. D. H. S. R. Rose Bengal and lissamine green vital stains: useful diagnostic aids for early stages of xerophthalmia. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:1559-1561, 1979.
115. LEÃO, J. V. A desnutrição no meio pré-escolar de Fortaleza. *Bol. Inst. Pueric.* 15:172, 1958.
116. LEWIS, C. L.; MEDOWELL, M. A.; SEMPOS, C. T.; LEWIS, K. C.; YETLEY, E. A. Relationship between age and serum vitamin A in children aged 4-11 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 51:353-360, 1990.
117. LOERCH, J. D.; UNDERWOOD, B. A.; LEWIS, K. C. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. *J. Nutr.* 109:778-786, 1979.
118. LOOKER, A. C.; JOHNSON, C. L.; WOTEKI, C. E.; YETLEY, E. A.; UNDERWOOD, B. Ethnic and racial differences in serum vitamin A levels of children aged 4-11 years. *Am. J. Clin. Nutr.* 47:247-252, 1988.

119. LUZEAU, R.; CARLIER, C.; ELLRODT, A.; AMÉDÉE-MANESME. Impression cytology with transfer: an easy method for detection of vitamin A deficiency. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 58(2):166-170, 1988.
120. MALVY, J. M. D.; MOUREY, M. S.; CARLIER, C.; CACES, P.; DOSTALOVA, L.; MONTAGNON, B.; AMÉDÉE-MANESME, O. Retinol, B-carotene and alfa-tocopherol status in a French population of health children. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 59(1):29-34, 1989.
121. MARINHO, H. A.; FRANCA, T. S.; REBELO, Y. S.; SHRIMPTON, R. Níveis séricos de vitamina A em operários de Manaus, Amazonas. *Acta Amaz.* 11(2):347-353, 1981.
122. MARTINEZ, H.; SIKAR, M.; LATHAN, M. Vitamin A supplementation and child mortality. *Lancet.* 2:451-452, 1986.
123. MAZILLI, R. N. & GANDRA, Y. R. Consumo alimentar de pré-escolares matriculados nos centros de educação e alimentação do pré-escolar (CEAPES) e de suas respectivas famílias. *Rev. Saúde Pública.* 15:(Supp) 23-32, 1981.
124. McLAREN, D. S. Present knowledge of vitamin A in health and disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60(4):436-455, 1966.
125. McLAREN, D. S. Global occurrence of vitamin A deficiency. Academic Press, 1986. p. 1-18.
126. MEJIA, L. A.; HODGES, R. E.; RUCKER, R. B. Clinic signs of anemia in vitamin A deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:1439-1444, 1979.
127. MEJIA, L. A. & CHEW, F. Hematologic effect of supplementing anemic children with vitamin alone or in combination with iron. *Am. J. Clin. Nutr.* 48:595-600, 1988.
128. MILLER, K. W.; LON, N. A.; YANG, C. S. Simultaneous determination of plasma retinol, alfa tocopherol, lycopene, alfa carotene and beta-carotene by high performance liquid chromatography. *Ann. Biochem.* 138:340-345, 1984.
129. MILLER, K. W. & YANG, C. S. An Isocratic high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis of plasma retinol, alfa-tocopherol, and various carotenoids. *Analy. Biochem.* 145:21-26, 1985.

130. MONTEIRO, C. A. **Saúde e nutrição das crianças de São Paulo:** diagnóstico, contrastes sociais e tendências. São Paulo, HUCITEC/EDUSP, 1988. 165 p.
131. MONTEIRO, C. A.; BENICIO, M. H.; GOUVEIA, N. C. Saúde e nutrição das crianças brasileiras no final da década de 80. In: IBGE. **Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil:** aspectos de saúde e nutrição de crianças no Brasil, 1989. Rio de Janeiro, 1989. p. 19-42, 1989.
132. MORI, S. Primary changes in eyes of rats which result from deficiency of fat-soluble a in diet. **J. Am. Med. Assoc.** 79(3):197-200, 1922.
133. MOURA, E. C. de. Perfil nutricional de crianças de creches particulares do município de Campinas/SP. **Ciênc./Assist.** 26:39-42, 1984.
134. MOURA CAMPOS, F. A. de. Vitamin A aparelho ocular. **Rev. Clin. Cient.** 12:414, 1943.
135. MOURA CAMPOS, F. A. de. Alguns problemas de fisiopatologia da nutrição. Diagnóstico da avitaminose A experimental. **Rev. Med.** 29(143): 424-430, 1945.
136. MOURIQUAND, G.; ROLLET, J. & CHAIX, M. Précaréence et avitaminose A **Paris Med.** 1: 419-425, 1930.
137. MUTO, V.; SMITH, J. E.; MILCH, P. O.; GOODMAN, D. S. Regulation of retinol binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. **J. Biol. Chem.** 217:2542-2550, 1972.
138. NATADISASTRA, G.; WITTPENN, J. R.; WEST, K. P.; MUHILAL; SOMMER, A. Impression cytology for detection of vitamin A deficiency. **Arch. Ophthalmol.** 105(9):1224-1228, 1987.
139. NATADISASTRA, G.; WITTPENN, J. R.; MUHILAL.; WEST, K. P.; MELE, L.; SOMMER, A. Impression cytology: a practical index of vitamin A status. **Am. J. Clin. Nutr.** 48:695-701, 1988.
140. NATARAJAN, U.; SANKARANAYANAN, A.; WALIA, B. N. S.; GANGULY, N. K. Conjunctival impression cytology in children with persistent diarrhea as indicator of pre-clinical vitamin A deficiency. **Ind. Pediat.** 27:437-442, 1990.

141. NATHANAIL, L. & POWERS, H. J. Vitamin A status of Gambian children: biochemical evaluation and conjunctival impression cytology. **Ann. Trop. Pediat.** 12: 67-73, 1992.
142. NIERENBERG, D. W. Determination of serum and plasma concentrations of retinol using high-performance liquid chromatography. **J. Chromat.** 311:239-248, 1984.
143. NIERENBERG, D. W. & LESTER, D. C. High pressure liquid chromatographic assays for retinol and beta-carotene: potential problems and solutions. **Nutr. Growth Cancer.** 3:215-225, 1986.
144. NIVALDO, J. Aspectos da alimentação no agreste de Pernambuco, durante a seca de 1952-53. **Rev. Bras. Med.** 12(9):619-623, 1955.
145. NOGUEIRA, JUNIOR, A. Sobre um novo teste diagnóstico da carência vitamínica A. **Arq. Bras. Nutr.** 7(5):301-346, 1950.
146. NOVAK, J. Quantitative analysis by gas chromatography. 2. ed. New York. Dekker, 1988. p. 135-143.
147. OLIVEIRA, J. E. D. de.; FAVARO, R. M. D. & DESAI, I. D. Progress in the diagnosis of hypovitaminosis A: Clinical and biochemical correlations. **Arch. Latinoam. Nutr.** 11(3):333-348, 1990.
148. OLSON, J. A. The biological role of vitamin A in maintainin epithelial tissues. **Isr. J. Med. Sci.** 8(8/9):1170-1178, 1972.
149. OLSON, J. A. Evaluation of vitamin A status in children. **World Rev. Diet.** 31:130-134, 1978.
150. OLSON, J. A. Liver vitamin A reserves of neonates, preschool children and adults dying of various cases in Salvador, Brazil. **Arch. Latinoam. Nutr.** 29(4):520-543, 1979.
151. OLSON, J. A. New approaches methods for the assessment of nutrition status of the individual. **Am. J. Clin. Nutr.** 35:1166-1168, 1982.
152. OLSON, J. Serum levels of vitamin A and carotenoids as reflectors of nutritional status. **J. Natl. Cancer. Inst.** 73(6):1439-1444, 1984.
153. ONG, D. E. & CHYTIL, F. Retinoic acid-binding and comparison to rat tissue retinol binding protein. **Biol.Chem.** 250:6113-6117, 1975.

154. OMS. (Organização Mundial de Saude). **Medicion del cambio del estado nutricional**. Genebra. OMS, 1983. 105 p.
155. PARAHYM, O. Adaptação visual entre os sertanejos nordestinos. **Imp. Med.** 337:42, 1945.
156. PEREIRA, M. V.; ABREU, L. V.; FREUSBERG, O. Observações clínicas em 64 crianças portadoras de hipovitaminose A. **Arq. Cat. Med.** 1:16-26, 1966.
157. PILCH, S. M. Analysis of vitamin A data from health and nutrition examination surveys. **J. Nutr.** 117:636-640, 1987.
158. POCOCK, S. J. **Clinical trials: a practical approach**. Chichester, John Wiley, 1983. 264 p.
159. PORTER, S. B.; ONG, D. E.; CHYTIL, F. Vitamin A status affects chromatin structure. **Intern. J. Vitam. Nutr. Res.** 56(1):11-20, 1986.
160. RAHMATHULLAH, L.; UNDERWOOD, B. A.; THULASIRAJ, R. D.; MILTON, R. C.; RAMASWAMY, K. & BABU, G. Reduced mortality among children in Southern India receiving a small weekly dose of vitamin A. **New Engl. J. Med.** 323:(14): 929-935, 1990.
161. RAICA JUNIOR, N.; SCOTT, J.; LOWRY, L.; SCOTT, J.; LOWRY, L.; SAUBERLICH, H. E. Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States. **Am. J. Clin. Nutr.** 25:291-296, 1972.
162. RAMOS, D. M. R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** 3:147-155, 1987.
163. RANKINS, J.; GREEN, N. R.; TREMPER, W.; SAPUNTZAKIS, M. S.; BOWEN, P.; NDIAYE, M. Undernutrition and vitamin A deficiency in the Department of Linguère, Longa region of Sénégal. **Am. J. Clin. Nutr.** 58(1):91-97, 1993.
164. RAO, V.; FRIEND, J.; THOFT, R. A.; UNDERWOOD, B. A.; REDDY, R. Conjunctival goblet cells and mitotic rate in children with retinol deficiency and measles. **Arch. Ophthalmol.** 105:378-380, 1987.
165. REDDY, V.; RAO, V.; ARUNJYOTHI & REDDY, M. Conjunctival impression cytology for assessment of vitamin A status. **Am. J. Clin. Nutr.** 50: 814-817, 1989.

166. RIPPS, H. Night blindness revisited: from man to molecules. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.** 23:588-609, 1982.
167. RIVERA, M. A. A. & RIVERA, F. A. Perfil nutricional da dieta de escolares e pré-escolares pertencentes a população de baixa renda. CCS, São Paulo. 8(1):12-14, 1986.
168. RODRIGUES GONÇALVES, M. C.; ASCIUTTI MOURA, L. S.; DINIZ, S.; OLIVEIRA, R. S.; CARTRI BENIGNA, M.J.; FREITAS LOLA, M. M.; MIRANDA SILVA, S. M. Status da vitamina "A" pela citologia de impressão conjuntival. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 45a. Reunião Anual. Recife, 1993. p. 970 (Anais, n. 1)
169. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Provitamin A determination problems and possible solutions. **Food Nutr. Bull.** 12(3):246-250, 1990.
170. ROELS, O. A.; DEBEIR, O.; TROUT, M. Vitamin A deficiency in Ruanda Urundi. **Trop. Geogr. Med.** 10:77-92, 1958.
171. RONCADA, M. J. Hipovitaminose "A". Níveis séricos de vitamina "A" e caroteno em populações litorâneas do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública.** 6:3-18, 1972.
172. RONCADA, M. J.; WILSON, D.; LUI NETTO, O.; NETTO, O. B.; KALIL, A. C. Investigação sobre a prevalência de xerofthalmia através de inquérito realizado junto a oftalmologistas brasileiros. **Rev. Saúde Pública.** 12: 51-156, 1978a.
173. RONCADA, M. J.; WILSON, O.; MAZZILLI, R.N. Vitamin A deficiency in communities of the state of São Paulo, Brazil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO, 1º, Rio de Janeiro, 1978. **Resumos.** 1978b. p. 193.
174. RONCADA, M. J.; WILSON, D.; NETTO LUI, A.; NETTO, O. B.; KALIL, A. C.; NUNES, M. de F.; OKANI, E. T. Hipovitaminose A em filhos de migrantes nacionais em trânsito pela capital do Estado de São Paulo, Brasil. Estudo clínico-bioquímico. **Rev. Saúde Pública.** 12:345-350, 1978c.
175. RONCADA, M. J. Diagnóstico precoce da xerofthalmia. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1979. 108 p. Tese (Livre Docência).

176. RONCADA, M. J.; WILSON, D.; MAZZZILI, R. N.; GANDRA, Y. R.
Hipovitaminose A em comunidades do Estado de São Paulo.
Rev. Saúde Pública. 15(3):338-349, 1981.
177. RONCADA, M. J.; WILSON, D.; OKANI, E. T.; AMINO, S. Prevalência de hipovitaminose A em pré-escolares de município da área metropolitana de São Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Pública.** 18:218-224, 1984.
178. RUYTER, M. G. M. & De LEENHEER, A. P. Determination of serum retinol (Vitamin A) by high-speed liquid chromatography. **Clin. Chem.** 22(10): 1593-1595, 1976.
179. SAMBA, C.; GALAN, P.; LUZEAU, R.; AMÉDÉE-MANESME, O. Vitamin A deficiency in pre-school age Congolese children during malarial attacks. Part I: utilisation of the impression cytology with transfer in an Equatorial country. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 60(3):215-223, 1990.
180. SANTOS, L. M. P.; DRICOT, J. M.; ASCIUTTI, L. S.; BENIGNA, M. J. C. N.; D'ANS, C. D. Estudo epidemiológico da xerofthalmia no estado da Paraíba. **Rev. Bras. Med.** 40(11/12):419-425, 1983a.
181. SANTOS, L. M. P.; DRICOT, J. M.; ASCIUTTI, L. S.; D'ANS, D. C. Xerophthalmia in the state of Paraíba, Northeast of Brazil: Clinical findings. **Am. J. Clin. Nutr.** 30(7):139-144, 1983b.
182. SANTOS, L. M. P. Prevalência da deficiência de vitamina A no Brasil: ênfase para a Região Nordeste. Salvador, 1988. (Relatório)
183. SEOANE, N. & LATHAN, M. C. Nutritional antropometry in the identification of malnutrition in childhood. **J. Trop. Pediat.** 17:98-103, 1971.
184. SHARMA, S. & UNDERWOOD, B. A. Evaluation of goblet cells in conjunctival impression cytology by multiple-step 7 two-step staining techniques. **Ind. J. Med. Res.** 90:233-236, 1989.
185. SHRIMPTON, R. Food consumption and dietary adequacy according to income in 1200 families, Manaus Amazonas, Brazil, 1973-1974. **Arch. Latinoam. Nutr.** 34(4):615-629, 1984.
186. SHRIMPTON, R. Vitamin A deficiency in Brazil: perspectives for food production oriented interventions. **Ecol. Food Nutr.** 23:261-271, 1989.
187. SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para ciências do comportamento.** São Paulo. McGraw Hill. 1975. 350 p.

188. SILVA, W. Inquérito sobre consumo de alimentos e nutrientes, avaliação do estado nutricional e situação econômica da população amazônica. **Bol. Com. Nac. Aliment.** 42(2):13, 1959.
189. SIMMONS, N. K. Xerophthalmia and blindness in northeast Brazil. **Am. J. Clin. Nutr.** 29:116-122, 1976.
190. SMITH, J. E. & GOODMAN, D. S.. Retinol-binding protein and the regulation of vitamin A transport. **Fed. Proc.** 38:2504-2509, 1979.
191. SOLE, G. de.; BELAY, Y.; ZEGEYE, B. Vitamin A deficiency in Southern Ethiopia. **Am. J. Clin. Nutr.** 45:780-784, 1987.
192. SOLON, F.; FERNANDEZ, T. L.; LATHAM, M. C.; POPKIN, B. M. An evaluation of strategies to control vitamin A deficiency in the Philippines. **Am. J. Clin. Nutr.** 32(7):1445-1453, 1979.
193. SOMMER, A.; EMRAN, N.; TJAKRASUDJATMA, S. Clinical characteristics of vitamin A responsive and nonresponsive Bitot's spots. **Am. J. Ophthalmol.** 90:160-171, 1980.
194. SOMMER, A. **Nutritional blindness: Xerophthalmia and keratomalacia.** New York, Oxford University Press, 1981.
195. SOMMER, A.; GREEN, W. R.; KENYON, K. R. Bitot's spots responsive and non responsive to vitamin A. Clinicopathologic correlations. **Arch. Ophthalmol.** 99(11):2014-2027, 1981a.
196. SOMMER, A.; HUSSAINI, G.; TARWOTJO, I.; SUSANTO, D. Incidence, prevalence, and scale of blinding malnutrition. **Lancet.** 6:1407-1408, 1981b.
197. SOMMER, A. & GREEN, W. R. Goblet cells response to vitamin A. **Am. J. Ophthalmol.** 94:213-215, 1982.
198. SOMMER, A. Effects of vitamin A deficiency on the ocular surface. **Ophthalmology.** 90:592-600, 1983.
199. SOMMER, A.; HUSSAINI, G.; TARWOTJO, I.; SUSANTO, D. Increased mortality in children with mild vitamin A deficiency. **Lancet.** 2: 585-588, 1983a.

200. SOMMER, A.; KATZ, J; TARWOTJO, I. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 40(11):1090-1095, 1984.
201. SOMMER, A.; DJUNAEDI, E.; LOEDEN, A. A.; TARWOTJO, I.; WEST, K.; TILDEN, R. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. *Lancet.* 1:1169-1173, 1986.
202. SOMMER, A.; TARWOTJO, I.; KATZ, J. Increased risk of xerophthalmia following diarrhea and respiratory disease comparison to rat tissue retinol binding protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:977-980, 1987.
203. SOMMER, A. Large dose vitamin A to control vitamin A deficiency. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 30(Supp.):37-41, 1989a.
204. SOMMER, A. New imperatives for an old vitamin (A). *J. Nutr.* 119: 96-100, 1989b.
205. STANTON, B. F.; CLEMENS, J. D.; WOJTYNIAK, B.; CLEMENS, J. D.; WOJTYNIAK, B. Risk factors for developing mild nutritional blindness in urban Bangladesh. *Am. J. Dis. Child.* 140(4):584-588, 1986.
206. SULLIVAN, W. R.; McCULLEY, J. P.; DOHLMAN, C. H. Return of goblet cells after vitamin A therapy in xerosis of the conjunctiva. *Am. J. Ophthalmol.* 75(4):720-725, 1973.
207. SUTHUTVORAVOOT, S. & OLSON, J. A. Plasma and liver concentrations of vitamin A in a normal population of urban Thai. *Am. J. Clin. Nutr.* 27(8):883-891, 1974.
208. SWEET, L. K. & K'ANG, H. J. Clinical and anatomic study of avitaminosis A among Chinese. *Am. J. Dis. Child.* 50:699-734, 1935.
209. TANUMIHARDJO, S. A.; BARUA, A. B.; OLSON, J. A. A modified relative dose response assay employing 3,4-didehydroretinol (vitamin A₂) in rats. *J. Nutr.* 57:127-132, 1987.
210. TANUMIHARDJO, S. A.; MUHILAL.; YUNIAR, Y.; PERMAESIH, D.; SULAIMAN, Z.; KARYADI, D.; OLSON, J. A. Vitamin A status in preschool-age Indonesian children as assessed by the modified relative dose response assay. *Am. J. Clin. Nutr.* 52:1068-1072, 1990.

211. TAVARES, J. Causas atuais da cegueira infantil. **J. Pediat.** 9(8):371-386, 1943.
212. TAVARES, C. A. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determinação de provitaminas A e carotenóides em alimentos "in natura" e processados; paper presented at the IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Brasil. 1988.
213. THYLEFORS, B. The world health organization's programme for the prevention of blindness. **Intl. Ophthalmol.** 14:211, 1990.
214. TIELSCH, J. M.; WEST JUNIOR, K. P.; KATZ, J.; CHIRAMBO, M. C.; SCHWAB, C.; JOHNSON, G. J.; TIZAZU, T.; SWARTWOOD, J.; SOMMER, A. Prevalence and severity of xerophthalmia in Southern Malawi. **Am. J. Epidemiol.** 124(4):561-568, 1986.
215. TSENG, S. C. G.; HIRTS, L. W.; MAUMENEE, A. E.; KENYON, K. R.; SUN, T. T.; GREEN, R. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. **Ophthalmology.** 91:545-552, 1984.
216. TSENG, S. C. G. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. **Ophthalmology.** 92:728-733, 1985.
217. UNDERWOOD, B. A.; SIEGEL, H.; WEISELL, R. C. Liver stores of vitamin A in a normal population dying suddenly or rapidly from unnatural causes in New York city. **Am. J. Clin. Nutr.** 23:1037-1042, 1970.
218. UNDERWOOD, B. A. Biochemical and histological methodologies for assessing vitamin A status in human populations. **Methode Enzymol.** 190:242-251, 1990a.
219. UNDERWOOD, B. A. Methods for assessment of vitamin A status. **J. Nutr.** 120:1459-1463, 1990b.
220. UNDERWOOD, B. A. Hypovitaminosis A: hidden hunger? **NU Nytt. U-landshals.** 6(3):4-9, 1992.
221. USHA, N.; SANKARANARAYANAN, A.; WALIA, B. N. S.; GANGULY, N. K. Assessment of preclinical vitamin A deficiency in children with persistent diarrhea. **J. Pediat. Gastroent. Nutr.** 13(2):168-175, 1991.
222. VITAMIN A and iron deficiency. **Nutr. Rev.** 47(4):119-121, 1989.

223. VITAMIN A administration reduces mortality and morbidity from severe measles in populations nonendemic for hypovitaminosis A. **Nutr. Rev.** 49(3):89-91, 1991.
224. WATERLOW, J. C.; BUZINA, R.; KELLER, W.; LANE, J. M.; NICHAMAN, M. Z.; TANNER, A. M. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. **World Health Organ.** 55(4):489-498, 1977.
225. WEST, K. P.; POKHREL, R. P. & KATZ, J. Efficacy of vitamin A in preschool child mortality in Nepal. **Lancet.** 338:67-71, 1991.
226. WILLETT, W. C.; POLK, B. F.; UNDERWOOD, B. A.; STAMPFER, M. J.; PRESSEL, S.; ROSNER, B.; TAYLOR, J. O.; SCHNEIDER, R.; HAMES, C. G. Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer. **New Engl. J. Med.** 310(7):430-434, 1984.
227. WILLIAMS, A. T. R. Simultaneous determination of serum vitamin A and E by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromat.** 341:198-201, 1985.
228. WILSON, O.; RONCADA, M. J.; LUI NETTO, A.; NETTO, B. Vitamin A deficiency in institutionalized children in the capital of the State of São Paulo, Brazil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO, 1º, Rio de Janeiro, 1978. **Resumes.** 1978. p. 195-255.
229. WILSON, D.; RONCADA, M. J.; MAZZILLI, R. N. Nutritional status of children inmates of a small institution for homeless children in the capital of the state of S. Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Pública.** 14(3):300-309, 1980.
230. WILSON, D.; RONCADA, M. J.; NETTO LUI, A.; NETTO, O. B. Hipovitaminose A em pré-escolares internados em uma instituição da capital do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública.** 15:395-400, 1981.
231. WILSON, D. & NERY, M. E. S. Hypovitaminosis A in Rio Grande do Sul, Brazil. Preliminary Study. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 24(Supp.):35-44, 1983.
232. WILSON, D. & RONCADA, M. J. Valor do corante vital rosa bengala como auxiliar no diagnóstico de xerose conjuntival em provas de triagem. **Rev. Saúde Pública.** 19:321-335, 1985.

233. WITTPENN, J. R.; TSENG, S. C. G. & SOMMER, A. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. **Arc. Ophthalmol.** 104:237-239, 1986.
234. WITTPENN, J. R.; NATADISASTRA, G.; MELE, L.; SOMMER, A. Reproducibility of determining vitamin A status by impression cytology. **Ophthalmol. Surv.** 19(8):559-561, 1988.
235. WOLBACH, S. B. & HOWE, P. R. Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. **J. Exp. Med.** 42(6):753-777, 1925.
236. WOLBACH, S. B. & BESSEY, O. A. Tissue changes in vitamin deficiencies. **Physiol. Rev.** 22(3):233-289, 1942.
237. WOLDE-GEBRIEL, Z.; DEMEKE, T.; WEST, C. E. Xerophthalmia in Ethiopia: a nationwide ophthalmological, biochemical and anthropometric survey. **Eur. J. Clin. Nutr.** 45:469-478, 1991.
238. WOLF, G. Recent progress in vitamin A research: nuclear retinoic acid receptors and their interaction with gene elements. **J. Nutr. Biochem.** 1(6):284-289, 1990.
239. WHO. World Health Organization. Vitamin A deficiency and xerophthalmia. Geneva, WHO/USAID. 1976. 88 p. (Tec. Rep. Séries, n. 590)
240. WHO. World Health Organization. Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. Geneva, WHO. 1982. 71 p (Tec. Rep. Séries, n. 672)
241. WHO. World Health Organization. **Vitamin A supplements: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia.** Geneva, WHO. 1988. p. 1-24..
242. WHO. World Health Organization. **Presenting and controlling iron deficiency anaemia: through primary health care. A guide for health administrators and programme managers.** Geneva. 1989. 58 p.
243. WYSS, R. Chromatography of retinoids. **J. Chromat.** 331:481-508, 1990.
244. YANG, C. S. & MAO-JUNG, L. Methodology of plasma retinol, tocopherol, and carotenoid assays in cancer prevention studies. **J. Nutr. Grow. Cancer.** 4:19-27, 1987.

245. YOKOYAMA, S. M. determinação de carotenóides com valor provitamínico A em vegetais não folhosos. 1989; trabalho apresentado no Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro. 1989.
246. YOUNG, J. B.; CORLETTE, M. B.; MILDRED, G.; CORLETTE, B. S.; FRANK, H. & TENN, N. Inadequacy of conjunctival smears in the diagnosis of slight vitamin A deficiency in adults. **J. Lab. Clin. Nut.** 23(7):663-670, 1938.
247. ZILE, M. H. & CULLUM, M. E. The function of vitamin A: current concepts. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 172:139-152, 1983.

ANEXO 1. Frequências absolutas e relativas de células caliciformes observadas no papel de celulose em ambos os olhos ou em um olho de crianças de favelas. Campinas, SP, 1991/1992.

NÚMERO	OLHO DIREITO		OLHO ESQUERDO		RESULTADO	
	N	%	N	%	N	%
0	27	9,1	26	9,6	5	1,7
2	1	0,3	5	1,8	-	-
3	2	1,0	2	0,7	1	0,4
4	-	-	4	1,5	-	-
5	13	4,4	4	1,5	5	1,7
6	5	1,7	3	1,1	2	0,7
7	4	1,3	8	3,0	4	1,3
8	10	3,4	12	3,0	10	3,4
9	1	0,3	3	1,1	1	0,4
10	33	11,1	31	11,4	37	12,4
11	1	0,3	1	0,4	-	-
12	5	1,7	7	2,6	9	3,0
13	-	-	3	1,1	1	0,3
14	4	1,3	7	2,6	6	2,0
≥ 15	180	60,4	147	54,2	197	66,1
Inconclusivos	12	4,0	8	3,0	20	6,7
TOTAL	298	100,0	263	100,0	298	100,0

ANEXO 2. Frequências absolutas e relativas dos níveis de retinol no soro de 131 crianças. Campinas, SP, 1991/1992.

RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)	N	%	RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)	N	%
0,48	1	0,8	1,01	3	2,3
0,49	2	1,5	1,03	1	0,8
0,50	1	0,8	1,05	1	0,8
0,51	1	0,8	1,06	1	0,8
0,52	1	0,8	1,09	7	5,3
0,55	1	0,8	1,11	2	1,5
0,56	1	0,8	1,13	1	0,8
0,57	3	2,3	1,14	3	2,3
0,58	2	1,5	1,16	1	0,8
0,60	1	0,8	1,18	1	0,8
0,61	1	0,8	1,19	2	1,5
0,63	4	3,1	1,20	2	1,5
0,65	1	0,8	1,21	1	0,8
0,66	1	0,8	1,22	1	0,8
0,67	1	0,8	1,23	2	1,5
0,69	1	0,8	1,25	2	1,5
0,70	1	0,8	1,26	2	1,5
0,71	1	0,8	1,28	1	0,8
0,72	2	1,5	1,29	1	0,8
0,73	3	2,3	1,30	1	0,8
0,74	1	0,8	1,35	1	0,8
0,75	4	3,1	1,36	1	0,8
0,76	2	1,5	1,38	1	0,8
0,77	4	3,1	1,42	1	0,8
0,78	1	0,8	1,45	1	0,8
0,79	2	1,5	1,50	1	0,8
0,80	2	1,5	1,51	1	0,8
0,81	3	2,3	1,52	1	0,8
0,82	4	3,1	1,53	1	0,8
0,83	2	1,5	1,54	1	0,8
0,84	2	1,5	1,58	1	0,8
0,85	1	0,8	1,60	1	0,8
0,86	3	2,3	1,64	2	1,5
0,88	1	0,8	1,66	2	1,5
0,89	2	1,5			
0,93	2	1,5			
0,94	1	0,8			
0,95	1	0,8			
0,96	2	1,5			
0,97	1	0,8			
0,98	2	1,5			
0,99	4	3,1			

FICHA 1. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DAS CRIANÇAS

1. IDENTIFICAÇÃO

Número do questionário _____ Data do exame ____/____/____
Nome da criança _____
Nome Pai/Mãe _____
Endereço _____
Bairro _____ Favela _____

2. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES:

Número de pessoas vivendo da renda familiar _____
Número de filhos: menores 7 anos _____
maiores 7 anos _____
Renda familiar:
Pai _____ Profissão _____
Instrução _____
Mãe _____ Profissão _____
Instrução _____
Outros _____ Profissão _____
Grau de parentesco _____
Total renda familiar _____
Renda per capita _____

Condições moradia: 1 - Barraco 3 - Alvenaria revestida
2 - Alvenaria

3. DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Data nascimento ____/____/____ Data exame ____/____/____
Sexo: 1 - Feminino 2- Masculino
Peso _____ g Altura _____ cm Idade ____ anos/____ meses

4. EXAME CLÍNICO OCULAR:

1 - olho direito

2 - olho esquerdo

Conjuntiva:

Aparência

Secreção

Xerose (localização)

Mancha Bitot+xerose

Observações: _____

Exame funcional ocular:

0 - Normal

1 - Anormal

Biomicroscopia

Fundo olho

Conjuntivite

Outro problema

Observações: _____

5. A criança apresentou algum tipo de doença nestes últimos dias?

Especificar _____

6. Consumo de vitaminas nos últimos 6 meses. Qual vitamina?

7. EXAME DE CICO

Aceite da criança: 1 - Bom 2 - Ruim

Realização do exame: 1 - somente um olho
2 - ambos olhos

Reação da criança _____

Repetição: 1- olho direito 2 - olho esquerdo

Observações _____

8. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

Resultado Lâmina: 1 - olho direito 2 - olho esquerdo

Resultado papel celulose: 1 olho direito 2 - olho esquerdo

Diagnóstico final _____

9. DADOS COMPLEMENTARES

Coleta sangue: 0 - sim 1 - não

Nível retinol no soro _____

Outros resultados:

10. SUPLEMENTAÇÃO

Início ____/____/____

Término ____/____/____

CICO: primeiro exame

Nível retinol no soro:

primeiro exame

segundo exame

Observação

FICHA 2. INQUÉRITO ALIMENTAR: Recordatório de 24 horas

Nome criança _____
Número _____ Data ____/____/____ Favela _____

HORÁRIO (hs)	ALIMENTOS	QUANTIDADE (medidas caseiras)	OBSERVAÇÃO
8:00			
10:00			
12:00			
15:00			
18:00			

FICHA 3. LISTA DE FREQUÊNCIA DE ALIMENTOS MAIS CONSUMIDOS PELAS CRIANÇAS

Nome criança _____
 Número _____ data coleta ____ / ____ / ____ Favela _____

ALIMENTOS	FREQUÊNCIA (Número de vezes)			PROCEDÊNCIA	
	DIÁRIO	SEMANAL*	MENSAL**	DOAÇÃO	PRÓPRIA
Hortaliças (<50ug)					
Batata (tipo)					
Chuchu					
Couve-flor					
Mandioquinha					
Pimentão					
Vagem					
(50-250ug)					
Alface					
Moranga					
Quiabo					
Tomate					
(> 250ug)					
Acelga					
Agrião					
Almeirão					
Brócolis					
Chicória					
Cebolinha					
Couve					
Cenoura					
Espinafre					
Rúcula					
Frutas(<50ug)					
Abacaxi					
Banana					
Morango					
Figo					
Pera					
(50-250ug)					
Abacate					
Goiaba					
Laranja					
Melancia					
Mixirica					
(>250ug)					
Manga					
Mamão					
Melão					
Leite					
Ovos					
Carnes					
Vaca					
Frango					
Linguiça					
Peixe					
Fígado/Miúdos					
Outros:					

* Consumo de no mínimo uma vez por semana

** Consumo de uma a três vezes durante o último mês da data de realização da entrevista.

FICHA 4 - DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

Nome da criança _____
Número _____

Data ____/____/____

Há células em quantidade suficiente para interpretação (40x)?

1 - Sim

2 - Não

LD _____ LE _____ PD _____ PE _____

Quantidade de células caliciformes (100x)

LD _____ LE _____ PD _____ PE _____

Observações _____

Células epiteliais

Aparência

Juntas

Separadas

Alargadas

Núcleo picnótico

Observações _____
Primeiro diagnóstico: _____

Diagnóstico definitivo