



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Comparaison entre deux techniques pour
la détection de l'hormone gonadotrophine
chorionique ou hCG

Présenté par : El –Mezraoui Asmae

Encadré par : Pr ELABIDA KAOUAKIB

Dr.GHRISSI KHALID

Soutenu le : 07/06/2017

Devant le jury composé de :

- Pr . ELABIDA KAOUAKIB
- Pr . BENCHEIKH RACHID
- Dr . GHRISSI KHALID

Stage effectué à : Laboratoire d'Analyses Médicales **GHRISSI**
Année universitaire 2016-2017

Introduction générale:

-Dans le domaine de la santé, les tests de laboratoire sont très importants pour le diagnostic, la surveillance des patients et leur traitement. Selon des études réalisées en Allemagne, les résultats des examens de laboratoire contribuent à l'établissement du diagnostic dans les deux tiers des cas, et aux Etats-Unis, cette proportion s'élève à hauteur d'environ 80%.

Les examens de biologie effectués au sein d'unité d'immunologie-sérologie (agglutination, ELISA, fixation du complément, séro-neutralisation) sont basées sur une réaction antigène - anticorps et la mesure de quantité d'anticorps spécifiques de celle-ci . comme ci le cas pour les hormones sexuelles gonadotrophines qui sont des hormones produites par différents tissus (hypophyse et placenta) dont la fonction principale est la régulation des gonades (ovaires et testicules). Les gonadotrophines comprennent la FSH (« folliculostimulating hormone »), la LH (« luteinizing hormone ») et l'hCG (« human chorionic gonadotropin») sont des hormones glycoprotéiques complexes. Dès le début de la grossesse, ces hormones inondent notre corps. Pendant neuf mois.

Dès la **fécondation**, , l'**œuf** produit déjà sa première hormone, l'hormone gonadotrophine chorionique (*HCG*) sans laquelle il ne pourrait pas se maintenir dans l'utérus. C'est cette hormone (**HCG**) qui nous annonce notre **grossesse** : Trois petites lettres pour un si grand bonheur.

L'objectif du travail :

Ce travail a pour but de comparer deux techniques utilisées pour déceler une grossesse débutante, par la présence d'une hormone gonadotrophine chorionique ou HCG sécrétée par le placenta.

Les tests de grossesses utilisés sont les suivants le premier test est un d'un dosage qualitatif de l'hormone hCG dans le sang ou dans les urines le deuxième c'est une méthode quantitative qui s'effectue seulement dans le sang.

Lieu de stage

• Présentation générale du laboratoire :

Avant d'entamer la description du laboratoire, il convient tout d'abord de présenter le cadre dans lequel le stage d'application a été effectué.

1. Historique :

Le **23 Mai 1985**, Le Biologiste Dr.GHRISSI Khalid a créé le Laboratoire d'analyses Médicales **GHRISSI**, à **Khénifra**, puis il a transféré à **Fès** le **23 Juin 2014**

2. Localisation :

Ce laboratoire est situé à Hay Saada Rue N°6 , Im 5 à Fès.

3. Secteur d'activité :

Le Laboratoire d'Analyses Médicales GHRISSI est une structure où des professionnels de la santé prélèvent et analysent différents fluides de l'organisme dans le but d'apporter des renseignements utiles à l'évaluation de l'état de santé des patients ainsi qu'à la prévention, le dépistage, le diagnostic et le traitement de maladies. Il s'agit de prélèvement de sang, de peaux, d'urines, de selles, de muqueuses...

4. Organisation du Laboratoire GHRISSI :

a. Equipements :

Le laboratoire Saada est équipé de plusieurs salles :

- Une salle d'accueil.
- Deux salles de prélèvements.
- Une salle d'Hématologie et la biochimie.
- Une salle d'analyses bactériologiques.
- Un bureau pour le biologiste.
- Une laverie.

.

b. Organisation du travail :

L'organisation du travail dans le laboratoire GHRISSI passe par trois phases :

- Accueil : Le travail de secrétariat regroupe plusieurs activités:
 - La réception des ordonnances.
 - La création des dossiers.
 - La restitution des résultats.
- Infirmierie : L'infirmier est responsable des prélèvements sanguins.
- Plateau Technique : Le laboratoire GHRISSI a concentré son activité sur les analyses médicales courantes dans les secteurs de:
 - Biochimie.
 - Hématologie.
 - Immunologie.
 - Sérologie.
 - Hormonologie.
 - Toxicologie.
 - Bactériologie et parasitologie.

Ces secteurs disposent :

- D'un personnel qualifié.
- D'un matériel de haute technologie.

Rappels

Bibliographiques

I .l'hormone gonadotrophine chorionique ou HCG:

1) La définition :

L'hormone chorionique gonadotrope humaine (**hCG**) est une glycoprotéine produite par le placenta en développement peu de temps après la fécondation. Dans le cas d'une grossesse normale l'hormone **hCG** peut être détectée aussi bien dans les urines que dans le sérum, et dès le 7^{ème} - 10^{ème} jour de la conception. Le taux de l'hCG continue d'augmenter très rapidement, et dépasse les 100 mUI/ml dès le premier jour de retard des règles et atteint un maximum de 100 000 -200 000 mUI/ml dès 10^{ème} -12^{ème} semaines de grossesse, et diminue puis se maintient jusqu'au terme de la grossesse¹.

La Présence de **hCG** dans l'urine et dans le sérum peu après la conception, et sa rapide augmentation au début de la gestation font de cette hormone un excellent indicateur² pour la détection d'une grossesse.

2) la structure³ :

Par sa structure, l'hCG est proche des trois hormones hypophysaire **LH** (L'hormone lutéinisante), **FSH** (l'hormone folliculo-stimulante), **TSH** (thyroestimuline)

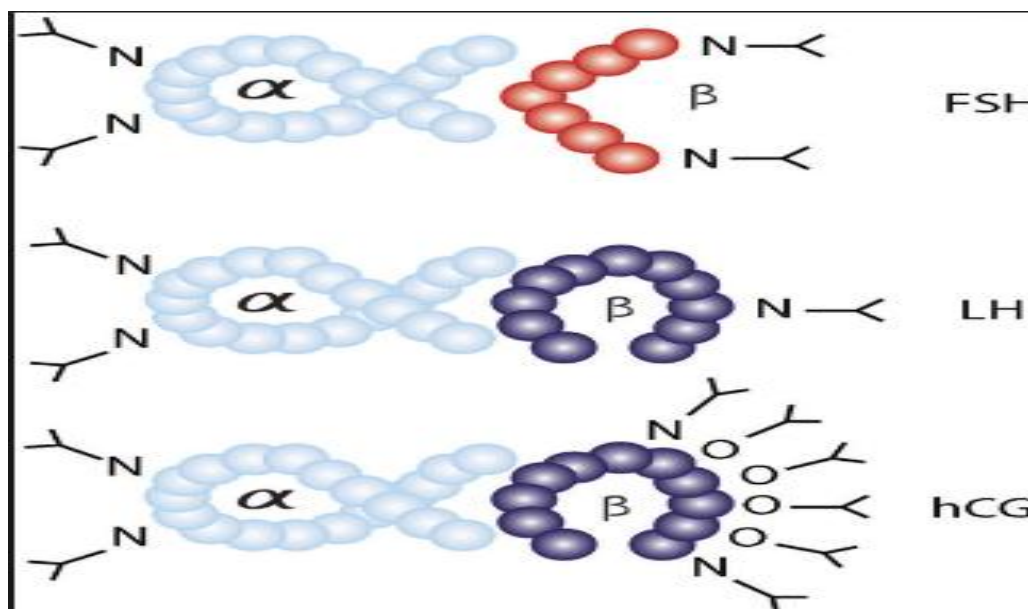


Figure 1 : structure des hormones FSH, LH, HCG

¹, ² hCG rapid test cassette REF WHCG-ec21

³ .http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2358-04292015000300002

La structure de l'hCG est composée de deux sous-unités polypeptidiques : La sous-unité α (92 acides aminés) qui est pratiquement identique pour ces quatre hormones. La sous-unité β de l'hCG comporte 145 acides aminés et cinq groupes oligosaccharidiques. C'est elle qui confère à l'hCG sa spécificité, et c'est la fraction intéressante de cette hormone, d'où le terme **β -hCG** utilisé souvent par abus de langage.

2) Le rôle physiologique :

Le rôle physiologique de l'hCG est d'une très grande importance est de stimuler le corps jaune de façon similaire que LH au début de grossesse, qui est à son tour secrète la progestérone qui contribue le maintien de la grossesse jusqu'au moment où de placenta prend le relais.

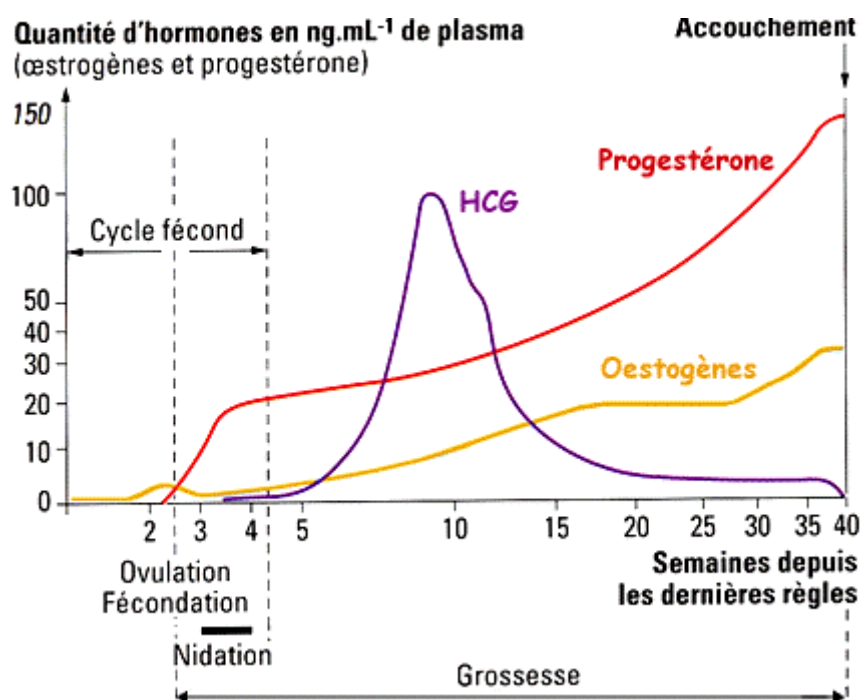


Figure 2⁴ : Graphique de l'évolution des taux d'hormones sexuelles chez la femme après un cycle fécond

⁴ <http://sport-grossesse.e-monsite.com/pages/c-le-sport-un-moment-de-partage.html>

D'autre part hCG joue un rôle capital dans la différenciation sexuelle de l'embryon en modulant la production d'hormone stéroïde par le testicule fœtale.

L'hCG pourrait avoir également une action relaxante au niveau du myomètre de vaisseaux

Utérins

3) La sécrétion :

La gonadotrophine chorionique humaine est sécrétée par le placenta dès sa formation a une demi-vie de 48 h. En début de grossesse c'est, le taux de la sous unité β -hCG qui prédomine. Dans le cas il y'a fécondation l'hormone peut être dosé 48h après l'implantation de l'œuf jusqu'à la fin de la grossesse, et elle disparaît totalement de l'organisme de la femme dans les 5 jours qui suivent l'accouchement.

La positivité du hCG plasmatique ne témoigne pas de la vitalité de l'embryon et du fœtus; elle témoigne seulement de la présence de cellules trophoblastiques actives ; pour cette raison on peut trouver des taux de hCG plasmatiques significativement élevés :

- pour grossesse qui vient de cesser d'évoluer (mort de l'embryon ou du fœtus)
- une grossesse de type œuf clair (sac gestationnel sans embryon)
- Et dans les grossesses môleuses : absence d'embryon ; absence de placenta avec dégénérescence vésiculaire des villosités trophoblastique et une hyperplasie cellulaire trophoblastique

II. Définition d'un test de grossesse :

Par définition un test de grossesse permet de détecter ou pas la présence ou l'absence d'une grossesse. A savoir l'hormone hCG secrétée par le placenta lors de la nidation de l'œuf dans l'utérus. Celle-ci est détectable environ une semaine après la fécondation. Il existe deux types de tests de grossesse : les tests urinaires et sanguins

Matériel et Méthodes

- Test de grossesse hCG sur cassette : 'hCG Rapid test cassette' :

❖ M



Figure 3 : coffret RightSign de test 'hCG rapid test cassette' .

- principe :

Le test de Grossesse 'hCG Rapid test cassette' est une méthode qualitative, son principe est basé sur un dosage immunologique rapide effectuant dans l'urine ou le sérum, utilisant une technique chromatographie pour réaliser un diagnostic précoce de la grossesse. Les résultats du test sont indiqués sur deux lignes :

- La ligne de contrôle dans la région © qui est composée d'anticorps polyclonaux de chèvre et de particules colloïdales d'or.

- La ligne du test dans la région (T) cette ligne utilise une association d'anticorps qui inclut un anticorps monoclonal hCG pour discriminer les taux élevés de l'hCG .

- La ligne du test dans la région (T) cette ligne utilise une association d'anticorps qui inclut un anticorps monoclonal hCG pour discriminer les taux élevés de l'hCG .

En cas de grossesse, il y a production d'hCG retrouvé dans le sang et l'urine

L'échantillon est transporté par action capillaire à travers la membrane nitrocellulose et réagit avec les couleurs.

Puis il y'a une fixation de l'hormone sur l'Ac anti-hCG

Le complexe Ac/Ag continue a migrer jusqu'à reconnaissance de l'Ag par un 2ème Ac spécifique : Arrêt de la migration dans la zone test (Voir la figure au dessous).

Légend :

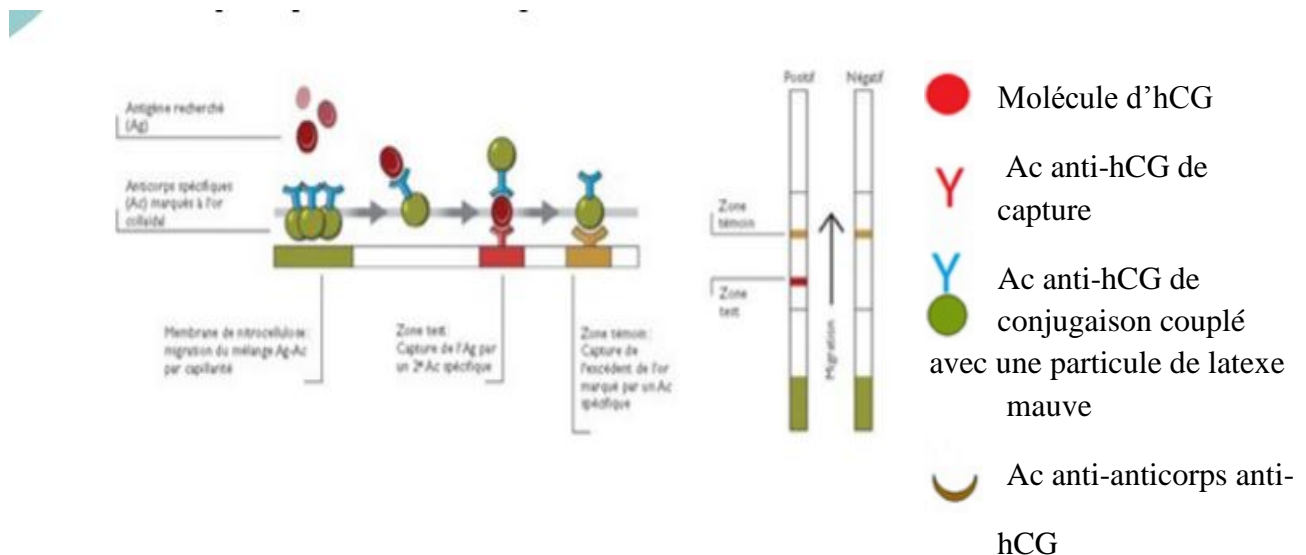


Figure 4⁵ : [Diagnostic Techniques Immuno- chromatographie \(Cas du test de grossesse\)](#)

NB* le même principe est respecté pour la méthode urinaire et la méthode sanguine.

- lecture:⁶

POSITIF : Deux lignes colorées différentes apparaissent. Une ligne apparaîtra dans la région de contrôle © et une autre ligne dans la région du test (T). L'intensité de la couleur de la ligne de la

⁵ <http://lestroislycennes.e-monsite.com/pages/i-le-test-de-grossesse.html>

⁶ hCG rapid test cassette REF WHCG-ec21(Mode d'emploi)

région du test (T) peut varier selon la concentration en hCG présente dans l'échantillon. C'est pourquoi toute coloration, aussi faible soit-elle, apparaissant sur la ligne de la région du test (T) devra être considérée comme un résultat positif.

Négatif : Une ligne colorée apparaît dans la région de contrôle (C). Aucune ligne colorée n'apparaît dans la région du test (T).

Invalide : La ligne de contrôle n'apparaît pas. Un volume d'échantillon insuffisant ou une technique incorrecte expliquent les défaillances les plus fréquentes de la ligne de contrôle. Revoir la procédure et refaire le test avec un nouveau dispositif.

Un contrôle interne de la procédure est inclus dans le test. La ligne colorée qui apparaît dans la région de contrôle © fait office de contrôle interne de la procédure. Elle confirme qu'il existe un volume d'échantillon suffisant et que la technique employée est bonne. Un fond clair est un contrôle interne négatif de la procédure. Si un fond de couleur apparaît sur la fenêtre des résultats et entrave la lecture des résultats du test, ces derniers ne seront pas valables. Il est recommandé d'évaluer un contrôle positif en hCG.



Figure 5 : Exemple d'un résultat négatif du test hCG

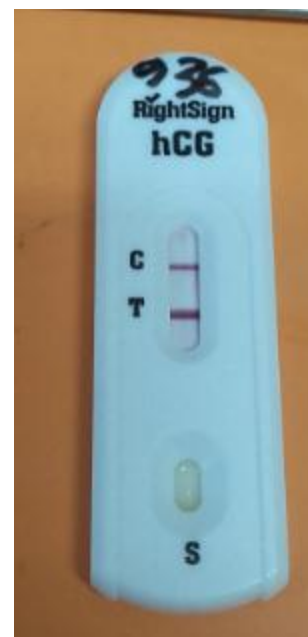


Figure 6 : Exemple d'un résultat positif du test hCG

Remarque :

- Ce test peut produire de faux résultats positifs. Outre la grossesse, plusieurs situations donnent lieu à des taux élevés de hCG, comme la maladie trophoblastique et certains

néoplasies non trophoblastiques comme les tumeurs du testicule, cancer de la prostate, cancer du sein et cancer du poumon. C'est pourquoi la présence de hCG dans un échantillon d'urine ou de sérum ne servira pas à diagnostiquer une grossesse si ces affections n'ont pas été écartées.

- Et il peut produire de faux résultats négatifs quand les taux de hCG se trouvent au dessous du niveau de sensibilité du test. Si l'on continue de soupçonner une grossesse, il faudra prélever la première urine matinale ou un échantillon de sérum 48 heures après, et refaire le test. En cas de suspicion de grossesse et de résultats négatifs continus, le médecin confirmera le diagnostic avec des résultats cliniques et analytiques.

- Matériel fourni :

Cassettes test, compte-gouttes, prospectus.

- Matériel nécessaire non fourni :

Chronomètre, récipient pour recueillir, échantillon.

- Conservation d'échantillons :

Les échantillons d'urine ou de sérum peuvent être conservés à 2-8°C pendant 48 heures avant d'être évalués. Pour une longue conservation, les échantillons doivent être congelés et stockés à au moins -20°C. Les échantillons doivent être décongelés et agités pour bien être mélangés avant utilisation.

❖ Méthode :

- Instructions d'utilisation :



Figure 7 : La mise en place du sérum sur la cassette a l'aide du compte-gouttes

- Il faut laisser le sachet se stabiliser à température ambiante avant de l'ouvrir. extraire la cassette de sachet scellé et l'utiliser dans l'heure qui suit.
- Placer la cassette sur une surface plane, a l'aide du compte-gouttes fourni, déposer en le tenant bien verticalement, 3 gouttes sans bulles d'aire (approximativement 120 UI) d'urine ou sérum dans le puits.
- Poser la cassette sur une surface plane, déclencher le chronomètre et attendre qu'une ou deux lignes colorées en rouge apparaissent.
- La lecture des résultats se fait 3 min minutes après pour l'analyse d'un échantillon d'urine, ou 5 minutes après pour l'analyse d'un échantillon de sérum.

REMARQUE :

- Il faut exclure toute réaction même si positive qui a lieu après 10 min de temps de lecture

NB* les memes instructions d'utilisation sont respectées pour la méthode urinaire et la méthode sanguine.

Les deux méthodes urinaire et sanguine ont le même principe et même instructions d'utilisation mais il se différent en quelque points :

- La méthode urinaire :

Il Faut Prélever un échantillon d'urine dans un récipient propre et sec. Le premier échantillon d'urine matinale est recommandé vu qu'il est en règle générale plus concentré en hCG. Cependant, il est possible d'utiliser des échantillons d'urine prélevés à tout moment de la journée. Les échantillons d'urine qui présente des précipités visibles devront être centrifugés, filtrés ou il faudra les laisser reposer afin d'obtenir un échantillon transparent pour la réalisation du test.

- La méthode sanguine :

Le sang sera prélevé dans des conditions d'asepsie, dans un tube propre sans anticoagulants. Séparer le sérum du sang aussitôt que possible pour éviter l'hémolyse. Si possible, utiliser des échantillons transparents non hémolysés.

II -Le test de Grossesse hCG par technique de VIDAS :

❖ Matériel

- Description et fonctionnement d'automate :

Mini VIDAS^{®7} est un instrument de paillasse qui s'appuie sur la technologie éprouvée ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) qui a fait de la famille **VIDAS[®]** un automate mondiale. C'est une version compacte du système VIDAS, intégrant l'ordinateur, le clavier et l'imprimante. Mini VIDAS comprend deux compartiments indépendants chacun acceptant 6 tests.



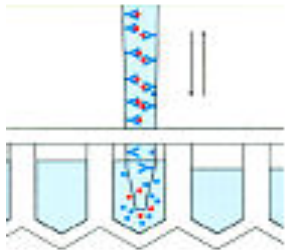
Figure 8 : L'automate Mini VIDAS

⁷ hCG rapid test cassette REF WHCG-ec21 (Mode d'emploi)

Comment fonctionne t-il ?

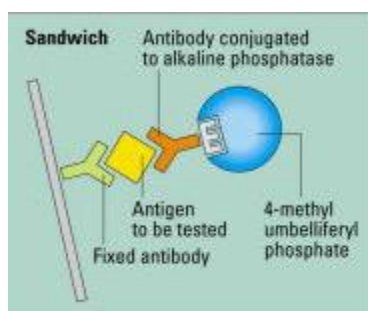
1) Capture de l'antigène :

L'anticorps capture le pathogène recherché



2) Test Sandwich :

Un second anticorps conjugué avec une enzyme se fixe à l'antigène capturé.



1) Détection










L'Intensité de la fluorescence est interprétée par le système.



- Compositions et reconstitution du coffret (60 tests) :

Chaque coffret contient comme identifications les informations suivantes :

Tableau 1⁸ : Table des symboles de coffret

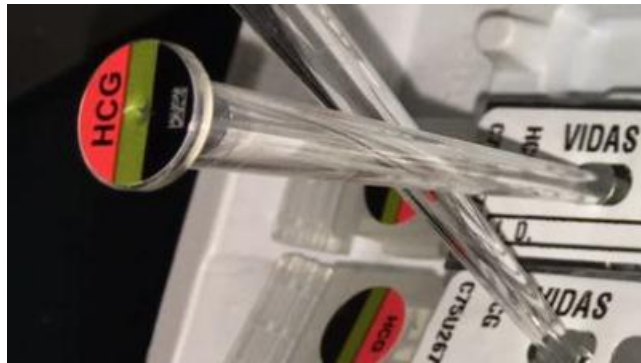
Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Date de fabrication

Et à l'intérieur du coffret on trouve des éléments nécessaires pour la réalisation du test hCG qui sont :

- ✓ Des données usine nécessaire à la calibration du test :
 - Données MLE (MASTER LOT ENTRY) fournies dans le kit , ou Code à barres MLE imprimé sur l'étiquette etui.
- ✓ 60 cartouches hCG : Prêtes à l'emploi.
- ✓ 60 Cônes hCG : Prêtes à l'emploi. Ces cônes sensibilisés par des immunoglobulines monoclonaux de souris anti-hCG.

⁸ Coffret biomérique de test hCG par technique VIDAS

✓ Le cône :



LE Cône (SPR) est sensibilisé au moment de la fabrication par des immunoglobulines monoclonales de souris anti-hcG. Chaque cône est identifié par le code HCG

✓ La cartouche :



Elle est composée de 10 puits recouverts d'une feuille d'aluminium scellée et étiquetée. L'impression comporte un code à barres reprenant principalement le code du test, le numéro de lot et la date de péremption du coffret .le premier puits comporte une partie prédécoupée pour faciliter l'introduction de l'échantillon. Le dernier puits est une cuvette permettant la lecture en fluorimétrie. Les différents réactifs nécessaires à l'analyse sont contenus dans les puits intermédiaires

Description de la cartouche de hCG :



Puits 1

<u>Puits</u>	<u>Réactifs</u>
<u>1</u>	puits échantillon
<u>2-3-4</u>	Puits vides
<u>5</u>	Conjugué : immunoglobulines monoclonales de souris anti-hCG marquées à la phosphatase alcaline + Azoture de Sodium 1 g/l (600µl)
<u>6-7</u>	Tampon de lavage : Phosphatase de sodium (0.01 mol/l) pH 7,4 +Azoture de sodium 1 g/l (600µl)
<u>8</u>	Tampon de lavage : diéthanolamine DEA* (1,1 mol/l Soit 11.5 %) pH 9.8 + Azoture de Sodium 1 g/l (600µl)
<u>9</u>	Puits vide
<u>10</u>	Cuvette de lecture avec Substrat : 4-Méthyl-Ombelliferyl Phosphate (0,6 mmol/l) +DEA** (0,62mol/l soit 6,6% pH 9,2) + Azoture de sodium 1 g/l (300µl)

- Matériel consommable nécessaires Mais non Fournis :

-Pipette à embout jetable permettant la distribution de 2ml et 100 µl.

-Gants non talquées à usage unique.

-Pour d'autre Matériels et consommables Spécifiques se référer au manuel utilisateur de l'instrument.

-Instrument de la famille VIDAS.

❖ Méthode

- Principe de dosage :

C'est un test quantitatif automatisé sur les instruments de la famille VIDAS, permettant la mesure quantitative de l'hormone chorionique Gonadotrope humaine dans le sérum ou le plasma humain.

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique sandwich à une détection finale en fluorescence ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

- Etape de dosage et Instructions d'utilisation :⁹



Figure 9 : La disposition de cône et la cartouche dans le compartiment de L'automate

Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel.

⁹ REF 30 405 VIDAS HCG

Dans une première étape : l'échantillon est prélevé puis transféré dans le puits contenant l'anticorps anti-hCG marqué à la phosphatase alcaline (conjugué). Le mélange échantillon/conjugué est aspiré et refoulé plusieurs fois dans le cône afin d'augmenter la vitesse de réaction. Cette opération permet à l'antigène de se lier d'une part aux immunoglobulines fixées sur le cône et d'autre part au conjugué formant ainsi un « sandwich ».

Lors d'une seconde étape : une saturation des sites de l'hCG restés libres est réalisée par aspiration et refoulement du conjugué contenu dans le cinquième puits de la cartouche. Des étapes de lavage éliminent les composés non fixés.

Lors de l'étape finale de révélation : le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon.

A la fin du test : les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée, puis imprimés.

- Les valeurs physiologiques attendues de l'hormone :¹⁰

Dans une population cliniquement en bonne santé et indemne de pathologie tumorales, les valeurs physiologiques suivantes ont trouvées :

- Hommes : < 3mIU/m
- Femmes cycliques < 4 mIU/ml
- Femmes Ménopausées < 13 mIU/ml
- Femme enceintes : (Voire tableau au-dessous)

Tableau 2 : Gonadotrophine chorionique humaine (hCG) plasmatique
Taux moyenne et limites en UI/L (Unité Internationale par litre)
Valeurs usuelles d'après la technique VIDAS BIOMERIEUX

Semaines d'aménorrhée	Limites (mIU/ml)
4-5	1500-23 000
5-6	3 400-135 300
6-7	10 500-161 000
7-8	18 000-209 000
8-9	37 500-219 000
9-10	42 800-218 700
10-11	21 800-193 200
11-12	20 300-166 100
12-13	15 400-190 000
13-14	2 800-176 100
2 ^é me trimestre (14-26)	
3 ^é me trimestre (26-39)	2 800-144 400

. Les échantillons présentant des concentrations en hCG supérieures à 1500 mIU/ml doivent être redosés après dilution au 1/20 voire 1/200 dans le diluant hCG .multiplier le résultat par le facteur de dilution pour obtenir un résultat finale

¹⁰ REF 30 405 VIDAS HCG

- Résultat

Cette étude a pour but d'étudier l'avantage et l'inconvénient de chacune de ces méthodes utilisées dans les tests de grossesse à savoir le test sur cassette qui est un test qualitatif et le test quantitatif obtenu par dosage de B-hCG plasmatique.

Après la validation des informations personnelles. La prise de DDR (la date de la dernière règle) est obligatoire et d'une très grande importance pour calculer les jours de retard, et Préciser la dilution utilisée pour le dosage de b-B-hCG plasmatique.

- Exemple 1 :

- 5 min après la réalisation du test qualitatif sanguin il y'a apparition d'une seule ligne rouge dans la zone © ce qui signifie que le test est négatif.



Figure 9 : résultat négatif d'un test qualitatif de hCG

Dans ce cas pour faire le dosage de hormone chorionique gonadotrophine il n'est pas nécessaire de faire une dilution pour le sérum car le Résultats de dosage ça sera <2 mIU/ml , comme c'est illustrer sur l' image ci-dessous :

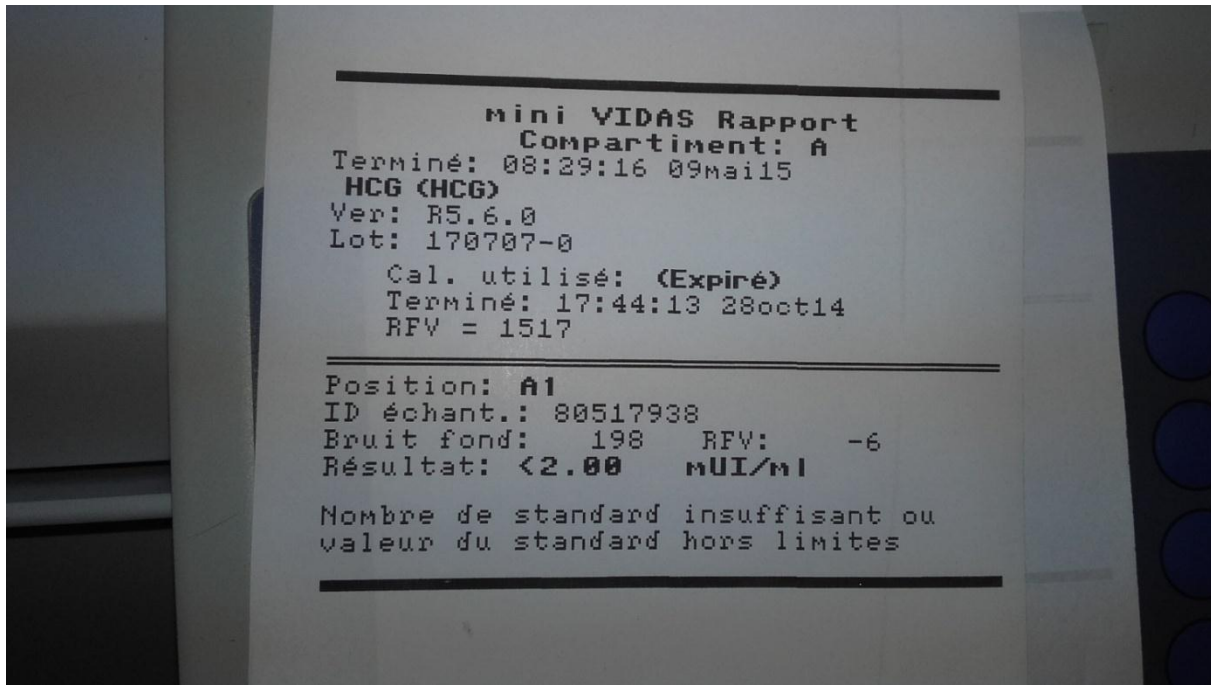


Figure10 : résultat négatif d'un test quantitatif de hCG

Dans ces deux cas le test est négatif .Le résultat du test quantitatif obtenue par dosage sérique de l'hormone hCG confirme les résultat du test qualitatif effectué sur cassette.

Conclusion :

Cette comparaison nous montre que les deux tests sont fiables, reproductibles et valable pour détecter la présence ou l'absence d'une grossesse. Mais un dosage sérique quantitatif est souhaitable pour confirmer le test cassette et doser le taux d'hormone hCG chez la femme ceci sur demande de gynécologue.

BIBLIOGRAPHIE

DOCUMENTATION ET SUPPORT :

Prospectus COFFRET rightsign : hCG rapid test cassette REF WHCG-ec21

Prospectus Coffret biomerieux de test hCG par technique VIDAS : REF 30 405 VIDAS HCG

SITE S WEB :

<http://sport-grossesse.e-monsite.com/pages/c-le-sport-un-moment-de-partage.html>

<http://lestroislycennes.e-monsite.com/pages/i-le-test-de-grossesse.html>

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2358-04292015000300002