

# RBAC

## REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

### SUMÁRIO

<b>Dermatofitose: etiologia e patogenia</b> .....	<b>59</b>
<i>Paulo Murillo Neufeld</i>	
<b>Dermatophytosis: etiology and pathogenesis</b>	
<b>A importância de <i>Candida dublinensis</i> no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas</b> .....	<b>65</b>
<i>Sydney Hartz Alves; Loiva T. Otonelli Oliveira &amp; Janio Moraes Santurio</i>	
<b>The importance of <i>Candida dublinensis</i> in laboratorial diagnostic of opportunistic mycosis</b>	
<b>Efeitos do quitosã e naringenina sobre lipídeos no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton</b> .....	<b>69</b>
<i>Lopes, R. M.; Oliveira, T. T.; Nagem, T. J.; Pinto, A. S.; Camini, N. A. &amp; Leão, M. A.</i>	
<b>Chitosan and naringenin effects on lipids in serum from hyperlipidemic rabbits induced by Triton</b>	
<b>Avaliação imunológica da leucemia mielóide aguda através da citometria de fluxo</b> .....	<b>73</b>
<i>Janaina Cristiana de Oliveira Crispim; Carla Kaline Fernandes Câmara; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca; Aldair de Souza Paiva; Francisco Fernandes do Nascimento Júnior; Maria Zélia Fernandes; Maria Cleide de Araújo Lopes; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva &amp; Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior</i>	
<b>Immunological evaluation of the acute myeloid leukemia by flow cytometry</b>	
<b>Piedra Negra - Relato de casos</b> .....	<b>81</b>
<i>Lima, E. O.; Oliveira, N. M. C.; Pontes, Z. B. V. S.; Carvalho, M. F. F. P. &amp; Guerra, M. F. L.</i>	
<b>Black piedra - case report</b>	
<b>Animais domésticos como reservatórios de espécies termófilas de <i>Campylobacter</i></b> .....	<b>83</b>
<i>Elisabeth Loshchagin Pizzolitto &amp; Antonio Carlos Pizzolitto</i>	
<b>Domestic animals as reservoirs of thermophilic species of <i>Campylobacter</i></b>	
<b>Os superantígenos e as doenças humanas</b> .....	<b>87</b>
<i>Melissa Siviero &amp; Shirley Rosa Utiyama</i>	
<b>The superantigens and the human diseases</b>	
<b>Estimativa dos lipídeos totais no soro baseada nas determinações de colesterol e/ou triglicérides</b> .....	<b>97</b>
<i>Daniela S. Gruber; Adriana Pinho-Pinto; Maria Cristina Guerra; Marcelo Kikuti; Aguinaldo José Nascimento; Marileia Scartezini; Vânia M. Alcântara &amp; Geraldo Picheth</i>	
<b>Total serum lipids estimated by total cholesterol and/or triglycerides</b>	
<b>O papel da Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)</b> .....	<b>101</b>
<i>Adriano Guardini; Jahiel M. de S. Tavares &amp; Maurício Pacheco de Andrade</i>	
<b>The role of human Chorionic Gonadotrophin (hCG) on the Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection</b>	
<b>Associação da trichomoníase com lesões pré-malignas e malignas do colo uterino</b> .....	<b>111</b>
<i>Eliete da Costa Silveira; André Tavenard &amp; Ediberto Nunes</i>	
<b>Association between trichomoniasis with pre-malign and malign lesions of the uterine cervix</b>	
<b>Temas Livres</b> .....	<b>115</b>

# 2

VOLUME 32

2000

# **A Importância de *Candida dublinensis* no Diagnóstico Laboratorial das Micoses Oportunistas \***

**The importance of *Candida dublinensis* in laboratorial diagnostic of opportunistic mycosis**

Sydney Hartz Alves <sup>1</sup> ; Loiva T. Otonelli Oliveira <sup>2</sup>; Janio Moraes Santurio<sup>3</sup>

---

**RESUMO-** *Candida dublinensis* é uma espécie recentemente descrita, filogeneticamente relacionada com *C.albicans* e comumente associada a episódios de candidíase oral em pacientes com SIDA. Neste artigo, revisamos aspectos importantes desta espécie como as características clínicas e epidemiológicas da micose bem como os principais aspectos fenotípicos e genotípicos desta levedura. Os problemas de identificação, a suscetibilidade aos antifúngicos e os fatores de virulência são também abordados.

**Unitermos:** *Candida dublinensis*; micoses; SIDA

**ABSTRACT-** *Candida dublinensis* is a newly described specie that is closely related phylogenetically to *C.albicans* and is commonly associated with oral candidiasis in human immunodeficiency virus positive patients. In this paper we review some important features like clinical and epidemiological aspects

of this mycosis, phenotypic and genotypic characteristics of this yeastlike fungi. Problems related with identification, susceptibility to antifungal agents and virulence factors, are also discussed.

**Key words:** *Candida dublinensis*; mycosis; AIDS

---

\*Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria. - RS

1- Professor Adjunto de Microbiologia Clínica, UFSM.

2- Farmacêutica-bioquímica. Laboratório de Micologia do Hospital Universitário de Santa Maria – RS

3- Professor Adjunto de Micologia Veterinária ; UFSM.

Correspondência:

Sydney Hartz Alves

Rua Venâncio Aires 2766/403

Santa Maria - RS .

97010-004

## INTRODUÇÃO

Nas infecções fúngicas dos pacientes imunocomprometidos, *C.albicans* ainda é a espécie mais prevalente; entretanto, outras espécies têm emergido destacando-se *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei* e *C.lusitaniae*<sup>1, 3</sup> em percentuais que variam geograficamente<sup>5</sup>.

Em 1995, Sullivan et al<sup>23</sup>, na Irlanda, estudando um grupo de leveduras do gênero *Candida* com características atípicas, descreveram uma nova espécie, nomeada *Candida dublinensis*. Desde então, esta espécie tem sido relatada em diversos países e, devido as peculiaridades que a envolvem, como a filamentação em soro a 37°C, seu reconhecimento e identificação merecem cuidadosa atenção, para diferenciação com *C.albicans*.

O objetivo do presente artigo é revisar sucintamente, aspectos clínicos, epidemiológicos e implicações terapêuticas das infecções causadas por *C.dublinensis*.

## ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

A grande maioria das cepas de *C.dublinensis* tem sido isoladas de lesões da cavidade oral de pacientes com SIDA, especialmente aqueles

evidenciando episódios recorrentes da forma eritematosa ou atrófica de candidíase oral<sup>10,21</sup>. Também tem sido detectada como causa de candidíases oral em indivíduos HIV positivos, em imunocomprometidos não infectados pelo HIV e, mesmo em indivíduos saudáveis<sup>26</sup>. Estes dados sugerem que a cavidade oral pode se constituir num nicho ecológico natural para *C.dublinensis*. As infecções em indivíduos sadios e imunocompetentes são raras, o que sugere que o sistema imune, em parceria com a microbiota normal previna o supercrescimento de *C.dublinensis*<sup>10</sup>. Assim, quando a imunidade conferida pelas células T estiver reduzida, a habilidade de se manter *C.dublinensis* em níveis baixos fica diminuída, permitindo seu crescimento<sup>10,24</sup>.

Além da boca, *C.dublinensis* tem sido isolada da vagina e fezes<sup>26</sup>. Há um relato de candidemia em paciente recebendo quimioterapia antineoplásica para rhabdomiossarcoma e em dois outros, após transplante de medula óssea<sup>13</sup>. Além destes casos, não há outras descrições de *C.dublinensis* causando infecções sistêmicas, o que merece contínua atenção.

Considerando que *C.dublinensis* é uma espécie recém caracterizada e cuja identificação requer procedimentos nem sempre disponíveis em laboratórios clínicos, os dados epidemiológicos disponíveis são ainda muito escassos. *C.dublinensis* já foi isolada em países como Argentina, Austrália,

Bélgica, Canadá, França, Finlândia, Alemanha, Grécia, Irlanda, Espanha, Suíça, reino Unido e Estados Unidos <sup>25</sup>. No Brasil, Milán et al <sup>14</sup> em São Paulo relataram o primeiro caso e Alves et al <sup>2</sup>, no Rio Grande do Sul, referiram o isolamento de 3 casos de candidíase causados por *C. dublinensis*.

Na população irlandesa, *C.dublinensis* foi isolada da boca de 27% de indivíduos HIV positivos e de 32% de pacientes com SIDA e candidíase oral. Da cavidade oral de indivíduos sadios foi isolada de 3% e, de indivíduos sadios mas com quadro de candidíase oral, chegou a 14,6% <sup>23,24,25</sup>. Segundo estes autores, os isolamentos de *C.dublinensis* como a única espécie causando candidíase foi de 24,5% dos casos observando-se nos demais, isolamento concomitante com *C.albicans* <sup>23,24,26</sup>.

Nos Estados Unidos, Kirkpatrick et al <sup>10</sup> estudando prospectivamente 63 pacientes com SIDA, observaram 32% de prevalência de *C.dublinensis* mas, considerando os 5500 isolados obtidos, *C.dublinensis* representou menos de 1%. Por outro lado, Jabra-Rizk et al <sup>8</sup> em 724 isolados produtores de tubo germinativo, apenas 7 (0,96%) foram identificados como *C.dublinensis*. Em nossa experiência, entre 250 cultivos obtidos da orofaringe de pacientes com SIDA, obtivemos o isolamento de 3 *C.dublinensis*, representando 1,2% das espécies isoladas (dados ainda não publicados). Desta forma, as discrepâncias entre os dados epidemiológicos de diferentes autores

pode ser explicada pela metodologia empregada para o primo-isolamento, pois, a concomitância com outras espécies de *Candida* é frequente e, características diferenciais não se observam nos meios de cultura rotineiramente empregados para isolamento.

Odds et al <sup>17</sup> revisaram 2589 cepas de uma coleção originalmente identificadas como *C.albicans*, objetivando avaliar a frequência histórica de *C.dublinensis*. Cinquenta e três amostras foram reidentificadas como *C.dublinensis*, sendo a mais antiga isolada em 1957 e, identificada como *Candida stellatoidea* . Também referem que 4 amostras de *C.dublinensis* desta coleção haviam sido isoladas de episódios de candidemias de pacientes com doenças hematológicas.

Sullivan et al <sup>26</sup> revisando as coleções de leveduras do Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS) da Holanda, reidentificou uma cepa de *C.dublinensis* isolada em 1952 e identificada como *Candida stellatoidea*. Pinjón et al <sup>21</sup> avaliando 110 amostras de uma coleção de leveduras isoladas da cavidade oral de indivíduos saudáveis, observaram que 1,8% eram *C.dublinensis* e que entre 79 isolados da boca de pacientes com SIDA, 16,5% eram *C.dublinensis*.

## CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

*C.dublinensis* se desenvolve bem no ágar Sabouraud dextrose a 30-37°C, formando colônias branco-cremosas, similares as de *C.albicans*. Emite tubo germinativo após 2h de incubação em soro humano a 37°C sendo, por isto, muitas vezes identificada como *C.albicans*<sup>23</sup>. Em meios de cultura empregados para a produção de clamidoconídios como o Corn meal agar ou similar, a grande maioria dos isolados de *C.dublinensis* produz abundantes clamidoconídios, formando pares ou trios nas extremidades das hifas<sup>23</sup>. Em *Candida albicans* são menos numerosos e frequentemente ocorrem isolados na extremidade de uma hifa<sup>11</sup>. Todavia, este critério de diferenciação não é seguro devido a subjetividade na quantificação e também porque esta não é uma característica sempre presente em *C.dublinensis*<sup>11,23,25,26</sup>.

A incapacidade de crescimento de *C.dublinensis* a 42 °C foi inicialmente observada por Sullivan et al<sup>23</sup> e, posteriormente utilizada para diferenciação com *C.albicans*, que se desenvolve bem nesta temperatura. A seguir, Pinjón et al<sup>21</sup> observaram que a temperatura de 45°C era mais eficaz na diferenciação entre *C.albicans* e *C.dublinensis*, sendo sugerida como um critério simples, de baixo custo, reprodutível e facilmente aplicável a um grande número de amostras, como teste de triagem.

O teste da temperatura requer provas complementares porque algumas cepas de *Candida stellatoidea* tipo I também não se desenvolvem a 42°C ou a 45°C. Assim, Pinjón et al <sup>21</sup> propõe que todas as cepas inibidas a 42-45°C sejam estudadas em relação a assimilação da sacarose e/ou que sejam sorotipadas. *Candida stellatoidea* tipo I não assimila sacarose e são do sorotipo B, enquanto que *C.dublinensis* são do sorotipo A e assimilam a sacarose.

Com relação as provas de assimilação, *C.dublinensis* assimila dextrose, galactose, maltose, sacarose, manitol, sorbitol e glucosamina; são incapazes de assimilar arabinose, xilose, ribose, sorbose, ramnose, celobiose, lactose, melibiose, refinose, glicerol, inositol, lactato, gluconato e KNO<sub>3</sub> <sup>23</sup>. A assimilação da trealose é variável, crescem na presença de ciclohexemide e não hidrolizam a esculina <sup>6,11,20,23,25</sup>.

Destas reações, a assimilação da sacarose e xilose são as mais utilizadas para a diferenciação de *C.dublinensis* com *C.albicans* e *C.stellatoidea*. Atualmente, *C.stellatoidea* é considerada sinônimo de *C.albicans*; todavia, para melhor caracterização de *C.dublinensis*, deve-se descartar a possibilidade de ser *C.stellatoidea*, pois, ambas são inibidas pelas temperaturas de 42-45°C <sup>25,26</sup>.

No perfil enzimático de *C.dublinensis* destaca-se sua incapacidade de expressar atividade de  $\beta$ -glicosidase, o que é evidenciado em todas as cepas de *C.albicans*<sup>4, 22, 24</sup>. Por outro lado, *C.dublinensis* evidencia intensa atividade de proteinase extracelular, se comparada com *C.albicans*<sup>24</sup>.

O estudo do bioquimismo de *C.dublinensis* permite a aplicação de algumas propriedades em meios de cultura que permitam uma identificação preliminar desta espécie. O CHROMagar Candida é um meio sólido contendo substratos cromogênicos que permitem a diferenciação das espécies com base na coloração das colônias<sup>10,16</sup>. Assim, no Chromagar Candida, após 48 h de incubação *C.albicans* evidencia colônias azul-esverdeadas enquanto que *C.dublinensis* apresenta colônias coradas de verde escuro. A limitação do Chromagar Candida é sua utilidade apenas no primo-isolamento ou primeiro repique porque *C.dublinensis* perde a capacidade de corar-se após sucessivos cultivos ou em cepas de coleção. A razão desta instabilidade não está clara mas admite-se que esteja relacionada com o *switching* fenotípico<sup>10</sup>.

Outro método de triagem baseado nas características bioquímicas é o ágar Sabouraud acrescido de *methyl blue 93* (Difco). Submetendo-se o crescimento fúngico à lâmpada de Wood, as colônias de *C.dublinensis* não fluorescem enquanto *C.albicans* apresenta intensa fluorescência. Esta

propriedade também é perdida após sucessivos sub-cultivos de *C.albicans*<sup>10,11</sup>. Similarmente ao que ocorre com o CHROMagar Candida, cepas de coleção são instáveis quanto a esta propriedade<sup>10, 19</sup>.

Outra interessante característica fenotípica de *C.dublinensis* é a coagregação. Observa-se nítida coagregação quando a uma suspensão de *C.dublinensis*, cultivada a 37°C, agregar-se um cultivo de *Fusobacterium nucleatum*. Como esse fenômeno também ocorre com *C.albicans*, mas não quando cultivada a 37°C, os autores sugerem que a coagregação possa se constituir num teste rápido e simples para a identificação de *C.dublinensis*. A nível bioquímico, a coagregação ocorre porque o *F.nucleatum* apresenta uma proteína receptora a um polissacarídeo ou proteína termo-estável de *C.dublinensis*<sup>9</sup>. Considerando que a grande maioria dos laboratórios clínicos de grande porte utiliza métodos automatizados para a identificação de bactérias e leveduras, Pincus et al<sup>20</sup> estudaram o comportamento de *Candida dublinensis* frente aos substratos mais utilizados, obtendo-se resultados que permitem a diferenciação com *C.albicans* de forma bastante satisfatória. Gales et al<sup>6</sup> compararam a identificação de *C.dublinensis* através da inibição a 42°C, utilização da xilose e  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, com os sistemas comerciais API 20C e Vitek YBC. Observaram que os sistemas comerciais são capazes de

diferenciar *C.albicans* de *C.dublinensis* tão efetivamente quanto os testes de temperatura e assimilação da xilose.

## CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS

Os estudos genotípicos inicialmente desenvolvidos por Sullivan et al <sup>23</sup> foram fundamentais para a definição de *C.dublinensis* como uma espécie diferente de *C.albicans* e *C.stellatoidea*.

Quando um grupo de cepas identificadas como *C.albicans*, porque evidenciavam tubo germinativo e clamidoconídios, foram tratadas com a enzima de restrição *EcoRI* e hibridizadas com a sonda 27A, o modelo de *fingerprint* obtido evidenciava menor número de bandas do que normalmente se observava em *C.albicans* <sup>23,24</sup>. Quando o DNA genômico é digerido com a enzima de restrição *Hinf I* obtém-se polimorfismo (restriction fragment length polymorphism) distinto de *C.albicans* ou de *C.stellatoidea* <sup>18</sup>.

A análise do polimorfismo amplificado randomicamente (RAPD) utilizando um grande número de oligonucleotídeos como *primers* resulta em distintos perfis de *C.dublinensis* <sup>23,25</sup>. Ao se comparar os cariótipos de *C.albicans* e *C.dublinensis*, após eletroforese em campo pulsátil, observa-se 7 ou 8 bandas para *C.albicans* e 10 ou mais bandas para *C.dublinensis* <sup>24</sup>.

A sequência de genes para rRNA tem se constituído numa técnica básica para se estabelecer estudos filogenéticos entre microrganismos porque,

além de altamente conservada em termos evolucionários, estão presentes em número elevado de cópias na maioria dos genomas de eucariotos. Com efeito, comparando-se a sequência de genes para rRNA de *C.dublinensis* com a sequência equivalente de *C.albicans*, observa-se 2,5% de divergência o que é similar aos percentuais das divergências genéticas que individualmente diferenciam outras espécies de *Candida* entre si<sup>23,24</sup>. Segundo os geneticistas há evidências para a separação de espécies quando houver mais de 1% de divergência entre dois microrganismos<sup>24</sup>.

## **A RESISTÊNCIA DE *C.dublinensis* A ANTIFÚNGICOS**

Os primeiros estudos de suscetibilidade de *C.dublinensis* frente aos antifúngicos detectaram 4 cepas resistentes ao fluconazol, numa população de 20 amostras<sup>15</sup>. Estes autores também observaram que a resistência ao fluconazol não se estendia aos demais azólicos nem a anfotericina B. Ademais, constataram que a exposição sequencial de *C.dublinensis* sensíveis ao fluconazol (CIM= 0,5µg/ml) a concentrações crescentes deste triazólico, determinava rápido desenvolvimento de resistência (CIM=64µg/ml) e ainda que tal resistência era estável mesmo após 10 sub-cultivos em meios isentos de antifúngicos.

A facilidade de *C.dublinensis* desenvolver resistência ao fluconazol é muito peculiar, pois, estudos similares realizados com *C.albicans* não observaram tal fenômeno mesmo após 148 subcultivos em meio contendo azólicos<sup>27</sup>.

Moran et al<sup>15</sup> também observaram que a indução da resistência *in vitro* ao fluconazol foi acompanhada de polimorfismos de DNA, indicando que rearranjos genéticos podem ocorrer sob forte pressão seletiva, talvez úteis ao fungo nas condições adversas determinadas pelo antifúngico. O mecanismo de resistência através do efluxo também tem sido sugerido, contudo, ainda não comprovado.

Os estudos de Odds et al<sup>17</sup> em relação a suscetibilidade em cepas de coleções indicaram, através da comparação das médias geométricas que *C.dublinensis* é mais sensível a anfotericina B e 5-fluorocitosina do que *C.albicans*, mas é significativamente menos sensível aos azólicos.

Considerando que *C.dublinensis* tem sido associada com episódios de candidíase recorrente em pacientes HIV positivos, há sugestões de que sua recente emergência como patógeno humano possa ser o resultado de uma seleção após prolongada utilização de antifúngicos. Todavia, vários estudos têm revelado que a grande maioria dos isolados de *C.dublinensis* são sensíveis aos antifúngicos<sup>15,19,26</sup>. Por outro lado, a comparação das médias

geométricas das CIMs de *C.dublinensis* e *C.albicans* frente aos fluconazol, itraconazol e cetoconazol, indicaram que *C.dublinensis* requer concentrações inibitórias mais elevadas do que *C.albicans*<sup>16</sup>. Este fato provavelmente represente uma vantagem seletiva de *C.dublinensis* o que justificaria sua recorrência nas candidoses dos pacientes com SIDA<sup>19,26</sup>. Até o momento, a resistência de *C.dublinensis* aos demais antifúngicos, não foi ainda relatada<sup>2,3,15,25</sup>.

### **OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *C.dublinensis***

As investigações sobre os fatores de virulência em *C.dublinensis* são escassas: no dimorfismo, a cinética de crescimento das hifas é mais lenta do que em *C.albicans*<sup>7</sup> o que pode contribuir para a aparente menor virulência desta espécie<sup>26</sup>. Por outro lado, possui os mesmos 7 genes *SAP* para proteinases e, um estudo<sup>24</sup> relatou que cepas de *C.dublinensis* apresentavam maior atividade de proteinase do que cepas de *C.albicans*. Também tem sido sugerido que *C.dublinensis* são mais aderentes ao epitélio bucal do que *C.albicans*<sup>12,24,26</sup>.

Outro fenômeno que pode contribuir para a virulência de *C.dublinensis* é sua forte interação com o *Fusobacterium nucleatum*. Este anaeróbio é frequente na placa sub-gengival de lesões periodontais, tendo importante função na colonização, uma vez que têm a capacidade de coagregar

leveduras como *C.dublinensis*<sup>9</sup>. Estudos nesta linha deverão ser incrementados, sobretudo em pacientes com SIDA, objetivando-se melhor compreender a patogênese das candidíases neste grupo de pacientes.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante das características fenotípicas e o potencial para desenvolvimento de resistência ao fluconazol, *Candida dublinensis* requer identificação precoce. No momento, vivemos a expectativa dos estudos que se delineiam tais como: desenvolvimento de meios de cultura para rápida e fácil identificação, o papel de *C.dublinensis* na fisiopatologia das candidíases, o potencial para resistência frente a outras drogas, outros fatores de virulência, além de estudos genéticos mais aprofundados. Por tudo isto, os laboratórios de Micologia devem estar atentos a esta nova espécie que, do grande mundo dos fungos, vem aumentar as dificuldades do diagnóstico micológico nas já complexas relações entre fungos e os hospedeiros imunocomprometidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a importante colaboração da Dra Eveline P.Milan, do Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina, pela identificação genotípica de nossas amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Abi-Said, D.F.; Anaissie, E.; Uzun, O .; Road, I.; Pinzcowski, H.; Vartivarian, S. – The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin.Infect.Dis** 24: 1122-1128, 1997.

2- Alves, S. H.; Silva, G. M.; Oliveira. L. T. O; Lopes, J. O; Link, A. ; Lubeck, I.; Scopel, P.A . – Perfil de suscetibilidade dos fungos leveduriformes isolados no Hospital Universitário de Santa Maria-RS. **XI Congresso Brasileiro de Infectologia**. São Paulo,1-4 agosto ,1999.

3- Berrouane, Y. F.; Herwaldt, L. A .; Pfaller, M. A . – Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **J. Clin. Microbiol** 37(3): 531-537, 1999.

4- Boerlin, P.; Boerlin-Petzold, F.; Durussel, C.; Addo, M.; Pagani, J.; Chave, P.; Bille, J. – Cluster of atypical *Candida* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. **J.Clin.Microbiol.** 33: 1129-1135, 1995.

5- Fridkin, S. K.; Jarvis, W. R. – Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.** **9** : 499-511, 1996.

6- Gales, A .,C.; Pfaller, M. A .; Hosuton, A . K.; Joly, S.; Sullivan, D.J.; Coleman, D.C.; Soll, D.R. – Identification of *Candida dublinensis* based on temperature and utilization of xylose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. **J. Clin. Microbiol.** **37** (12): 3804-3808, 1999.

7- Gilfillan, G.D.; Sullivan, D.J.; Haynes, K.; Parkinson, T.; Coleman, D.C.; Gow, N. A .R. - *Candida dublinensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology** **144**: 829-838, 1998.

8- Jabra-Rizk, M. A .; Baqui, A . M.A .; Kelley, J .I.; Falkler, W. A .; Merz, W. G.; Meiller, T. F. - Identification of *Candida dublinensis* in a prospective study of patients in the United States. **J. Clin. Microbiol.** **37**(3):321-326, 1999.

9- Jabra-Rizk, M. A .; Falkler, W,A .; Merz, W. G.; Kelley, J. I.; Baqui.A .M.A .; Meiler,T.F. – Coaggregation of *Candida dublinensis* with *Fusobacterium nucleatum*. **J. Clin. Microbiol.** **37(5)**: 1464-1468, 1999.

10- Kirkpatrick, W. R.; Revankar, S. Y. G.; McAtee, R. K.; Lopez-Ribot, J. L.; Fothergill, A .W.; McCarthy, D.I .; et al – Detection of *Candida dublinensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in north America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. **J. Clin. Microbiol.** **36 (10)**: 3007-3012, 1998.

11- Koehler, A .P.; Chu, K.C.; Houang,E.T.S.; Cheng, A .F.B. – Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.** **37(2)**: 422-426, 1999.

12- McCullough, M.; Ros, B.; Reode, P. – Characterization of genetically distinct sub-group of *C.albicans* strains from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.** **33**: 696-700, 1995.

13- Meis, J. F.; Runhke, M .; De Pauw, B. E.; Odds, F. C.; Siegert, D.; Verweij, P. E. – *Candida dublinensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone-marrow transplantation. **Emergent Infect. Dis.** **5** : 150-153, 1999.

14- Milán, E. P.; Colombo, A .L.; Laet Sant' Ana P.; Lewi, D. S.; Melo, A .S.A. – Primeiro isolamento de *Candida dublinensis* no Brasil. **XI Congresso Brasileiro de Infectologia**. São Paulo 1-4 agosto, 1999. Poster 301.

15- Moran, G. P.; Sullivan, D. J.; Henman, M. C.; McCreary, C. E.; Harrington, B. J.; Shanley, D. B.; Coleman, D. C. – Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dublinensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazol-resistant derivatives in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.** **41(3)**: 617-623, 1997.

16- Odds, F.C.; Bernaerts,R. – CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.** **32**: 1923-1929, 1994.

17- Odds, F. C.; Nuffel, L. C.; Dams, G. – Prevalence of *Candida dublinensis* isolates in a yeast stock collection. **J. Clin. Microbiol** **36** (10): 2869-2873, 1998.

18- Peterson, S.W.; Kurtzman, C. P. – Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Syst. Appl. Microbiol.** **14**: 124-129, 1991.

19- Pfaller, M. A .; Messer, S. A .; Gee, S. – In vitro susceptibilities of *Candida dublinensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.** **37**(3) : 870-872, 1999.

20- Pincus, D. H.; Coleman, D. C.; Pruitt. W. R.; Padhye, A .; Salkin, I .F.; Geimer, M.; Bassel, A .; Sullivan, D. J.; Clarke, M.; Hearn, V. --Rapid identification of *Candida dublinensis* with commercial yeast identification systems. **J. Clin. Microbiol.** **37** (11): 3533-3539, 1999.

21- Pinjon, E.; Sullivan, D.; Salkin, I.; Shanley, D.; Coleman, D. – Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dublinensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** **36**(7): 2093-2095, 1998.

22- Schoofs, A .; Odds, F.C.; Colebunders, R.; Ieven, M.; Goosens, H. – Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dublinensis* isolates from HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Infect.Dis.** **16**: 296-300, 1997.

23-Sullivan, D.J.; Westerneng, T. J.; Haynes, K. A .; Bennett, D. E.; Coleman, D.C. – *Candida dublinensis sp nov.*: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology** **141**: 1507-1521, 1995.

24- Sullivan, D.; Coleman, D. – *Candida dublinensis*: characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.** **36** (2): 329-334, 1998.

25 - Sullivan, D. J.; Haynes, K.; Bille, J.; Boerkin,P.; Rodero, L.; Lloyd,S.; Henman, M.; Coleman, D. – Widespread geographic distribution of oral *Candida dublinensis* strain in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J. Clin. Microbiol.** **35**: 960-964, 1997.

26- Sullivan, D. J.; Moran, G.; Donnelly, S.; Gee, S.; Pinjon, E .; McCartan, B.; Shanley, D. B.; Coleman, D. C. – *Candida dublinensis*: na update. **Rev Iberoam. Micol. 16**: 72-76, 1999.

27- Vanden Bossche, H.; Marichal, P.; Gorrens, J.; Bellens, D.; Moereels, H.; Jansen ,P.A J. – Mutation in cytochrome P-450 dependent 14  $\alpha$ -demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. **Biochemical Society Transactions 18** : 56-59,1990.

Animais domésticos como reservatórios de espécies termófilas de *Campylobacter* \*

Domestic animals as reservoirs of termophylic species of *Campylobacter*

Elisabeth Loshchagin Pizzolitto & Antonio Carlos Pizzolitto

### Resumo

O isolamento de espécies termófilas de *Campylobacter* das fezes de cães e vísceras de frangos foi observado em caldo Brucella (DIFCO) enriquecido com sangue de carneiro e mistura dos antibióticos (vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina e cefalotina-CEFAR), como proposto por Blazer et al. (1979). A análise foi feita em 132 culturas de materiais biológicos de cães, com 8,3% de positividade e 212 de frangos com 62,2% de positividade. As espécies termófilas isoladas foram classificadas como *Campylobacter jejuni*, biotipo 1 e *C. lari*. As cepas de *C. jejuni* são sensíveis ao ácido nalidíxico (disco-30µg) e resistentes à cefalotina (disco-30µg). O *C. lari* é resistente ao ácido nalidíxico e cefalotina (discos de 30µg). Ambas espécies desenvolvem-se bem a 37 e 43°C, mas não à 25°C. As espécies termófilas de *Campylobacter* atuam como patógenos entéricos.

**Palavras-chave:** espécies termófilas de *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. lari*, gastroenteritis.

**Summary:** The isolation of the termophylic species of *Campylobacter* from feces of dogs and of chickens was studied using Brucella broth (DIFCO) enriched with sheep blood and supplemented with the antibiotics (vancomycin, trimethoprim, polymyxin B, amphotericin and cephalothin-CEFAR), as proposed by Blazer et al. (1979). The percent of *Campylobacter* species in the 132 biological materials of dogs was 8.3% and 62.2% for 212 chickens. The termophylic species isolated were classified as *Campylobacter jejuni*, biotype 1, and *C. lari*. The strains of *C. jejuni* were sensitive to nalidixic acid (disk-30g) and resistant to cephalothin (disk-30g). The *C. lari* is resistant to nalidixic acid, and cephalothin (disks of 30g). Both species grew well at 37°C and 43°C, but not at 25°C. The *Campylobacter* termophylic species proved to be enteric pathogens.

**Key words:** Thermophilic species of *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. lari*, gastroenteritis.

---

\* Laboratório de Análises Clínicas "Prof. Antonio Longo" do Núcleo de Atendimento à Comunidade - NAC da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, câmpus de Araraquara-UNESP.  
Rua Expedicionários do Brasil, 1621. CEP 14801-360 Araraquara-SP.  
pizzolel@fctfar.unesp.br

**Introdução:** Os membros do gênero *Campylobacter* são patogênicos para homens e animais[15]. Relacionados a processos infecciosos no homem são encontrados, o *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*, os três últimos capazes de crescer a 43°C e por esta razão denominados "espécies termófilas". A maior importância desta espécie é a associação com processos de gastroenterites em adultos e crianças, cuja frequência conjunta de isolamento é similar e, as vezes, maior que a de outros enteropatogênicos [7, 8, 10, 14, 16]. Existem, entretanto vários aspectos, relacionados com a epidemiologia da gastroenterite causada pelo *Campylobacter*, como os animais domésticos, de criação e alimentos contaminados variáveis com o grau de desenvolvimento dos países, como fontes de contaminação[2, 3, 4, 5, 8, 11, 13, 17].

O isolamento e identificação de *Campylobacter* nestas fontes, contribuirão como dados adicionais importantes para o melhor conhecimento da epidemiologia e patogênese destas infecções[6, 9, 12, 18, 21]. Em nosso meio, os raros estudos realizados sobre possíveis transmissores e/ou reservatórios como fonte de contaminação de espécies termófilas de *Campylobacter*[4, 8, 10, 11, 20], estimulou a realização desta pesquisa. O objetivo deste trabalho é de verificar a frequência de isolamento das espécies termófilas de *Campylobacter*, a partir de materiais biológicos de duas diferentes espécies de animais domésticos, utilizando esquema simplificado de identificação por meio de provas "bioquímico-fisiológicas".

**Materiais e Métodos:** Nos períodos compreendidos entre março de 1986 a março de 1988 e setembro a dezembro de 1997, foram examinadas bacteriologicamente fezes de origem animal (cães e frangos), num total de 344 amostras, para isolamento de espécies termófilas de *Campylobacter*.

Considerou-se para os cães dois grupos, quanto a presença ou ausência de sintomas gastrointestinais, respectivamente, 56 casos com diarreia e 76 do grupo controle, subdivididos em duas faixas etárias: maiores e menores de 6 meses. As fezes foram colhidas com auxílio de "swab" retal.

O material foi levado diretamente ao meio de isolamento, ágar Brucella ou "Campy-BAP" (Brucella Broth-Difco-28,0g; ágar-15,0g; água destilada-1.000,0mL e os suplementos: mistura "Campylofar"(vancomicina-1,0mg%; trimetoprim-0,5mg%; polimixinaB-250UI%; anfotericinaB-0,2mg% e cafalotina-1,5mg%)-CEFAR-10,0mL; sangue de carneiro desfibrinado-100,0mL), proposto por Blazer et al., 1979 (2) e meio "Campy-Thio" (Meio tioglicolato sem indicador-1000,0mL; ágar-1,6g; suplementado com a mistura "Campylofar"-10,0mL, rolando o "swab" sobre a superfície do meio numa área de 1,0cm<sup>2</sup>, e a seguir, com alça bacteriológica semeado em estrias para isolamento. As placas foram incubadas a 42-43°C com leituras diárias até 72 horas, em microaerofilia (método da vela) que é satisfatório para os microrganismos.

Dos frangos, as amostras foram retiradas diretamente da cloaca, antes da lavagem final do animal já sacrificado e, na fase de industrialização, imediatamente

anterior à evisceração (descloacamento). O abate foi realizado em matadouro sob inspeção federal, foram pesquisados três lotes de frangos da raça Hubberd em número de 63, 77 e 72 animais, respectivamente com 51, 52 e 50 dias de idade. Seguiu-se o mesmo procedimento laboratorial, realizado com os materiais fecais de cães, para o isolamento de *Campylobacter* dos frangos.

Após o período de incubação as culturas foram examinadas para detectar colônias com as características: pequenas, mucóides, planas, não hemolíticas, cinzas ou incolores, consideradas suspeitas para *Campylobacter*.

As colônias, duas de cada tipo morfológico, foram selecionadas para as provas de identificação presuntiva, como descritas a seguir: (1) utilizou-se a coloração de Gram, modificada com a carbol-fucsina. Todas as amostras apresentaram morfologia de bacilos Gram-negativos curvos ou espirilados, com arranjos em “asas de gaivota” com tendências a formação de formas cocóides nas culturas mais velhas. (2) provas da catalase (+) e da oxidase (+). As colônias suspeitas foram, presuntivamente, identificadas como *Campylobacter* sp.

A seguir foram repicadas para tubos com o meio “Campy-Thio”, incubados a 42-43°C por 48 horas e a partir daí, foram realizadas as provas bioquímico-fisiológicas de confirmação: hidrólise do hipurato, crescimento a 25, 37, 43°C e sensibilidade ao ácido nalidíxico.

**Resultados:** Os resultados obtidos em relação a freqüência de isolamento, em 344 amostras biológicas analisadas, com percentuais de positividade de 8,3 e 62,2, respectivamente, para amostras de origem canina e avícola das espécies termófilas de *Campylobacter*, estão apresentados na tabela I. Com relação a freqüência de isolamento de *Campylobacter* termófilos em animais inferiores, os dados globais estão apresentados nas tabelas II, III, IV.

Tabela I - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em 344 amostras de animais domésticos

Origem Da amostra	Número de culturas			Porcentagem de positividade
	Positivas	Negativas	Total	
Canina	11	121	132	8,3
Avícola	132	80	212	62,2
<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>201</b>	<b>344</b>	<b>70,5</b>

Tabela II - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em cães, segundo os grupos estudados

Grupo	Número de culturas			Porcentagem de positividade
	Positivas	Negativas	Total	
Diarréico	5	51	56	8,9
Controle	6	70	76	7,9
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>121</b>	<b>132</b>	<b>8,3</b>

Tabela III - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em cães, segundo as faixas etárias

Faixa etária	Diarréico			Controle		
	Casos	Positivos	%Posit.	Casos	Positivos	%Posit.
< 6 meses	34	4	11,7	31	5	16,1
> 6 meses	22	1	4,5	45	1	2,2
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>5</b>	<b>8,9</b>	<b>76</b>	<b>6</b>	<b>7,9</b>

Tabela IV - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp Termófilos em frangos

Origem da amostra	Idade dias	Número de culturas			Porcentagem de positividade
		positivas	negativas	total	
Avícola	51	53	10	63	84,1
	52	46	31	77	59,7
	50	33	39	72	45,8
<b>Total</b>		<b>132</b>	<b>80</b>	<b>212</b>	<b>62,2</b>

Na identificação, por espécie e biotipagem, as amostras bacterianas isoladas apresentaram um comportamento frente as “provas bioquímico-fisiológicas”, tabela V, que permitiu caracterizá-las como *Campylobacter jejuni*, do biotipo I de Skirrow e Benjamin e como *C. lari*.

Tabela V- Características bióticas das amostras termófilas de *Campylobacter* isoladas.

Organismos	Reações Bioquímicas				Desenvolvimento à			Outros Testes	
	Oxidase	Catalase	H <sub>2</sub> S	Hipurato	25°C	36°C	42°C	Ác.Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	-	+	+	S	R
<i>C. lari</i>	+	+	+	-	-	+	+	R	R

Legenda: H<sub>2</sub>S-Sulfeto em papel de acetato de chumbo; Hipurato- hidrólise do hipurato; (-) não crescimento; (+) crescimento; R-resistente; S-Sensível

**Discussão:** Em relação, ao biotipo encontrado, neste estudo, é semelhante ao relatado por Jaramillo (1983)[10], Figueroa et al. (1990) [6] que mostraram a prevalência, do *Campylobacter jejuni* biotipo 1 em cães e em frangos as espécies *C. jejuni* e *C. lari*. O biotipo 1 é considerado o mais importante patógeno entérico, de acordo com, Gallardo et al. (1998)[7]. Os cães e as aves são os principais reservatórios, entre os animais domésticos, destas bactérias. Os animais, experimentalmente infectados, também constituem-se em fonte de infecção em laboratório. Evidências a esta sugestão é que, alguns sorotipos de *Campylobacter* que causam doenças em humanos, tem sido isolados de animais Blaser et al. (1983)[3], Biosafety in Microbiology (1998)[1]. A ocorrência da doença em humanos associada a uma fonte canina de contaminação é relatada por alguns pesquisadores, com prevalência maior quando os animais são filhotes, cães vadios ou de canil e inversamente quando comparadas a cães adultos criados em residências, Fleming (1983)[5], Gruber et al. (1985)[8]. A responsabilidade dos filhotes de cães como veiculadores de *Campylobacter* pode ser visto pela frequência com que esses microrganismos são isolados naqueles animais.

Neste trabalho, observou-se que para animais de faixas etárias, menores ou maiores de 6 meses, encontrou-se valores respectivamente de 11,7 e 4,5% nos animais diarreicos e de 16,1 e 2,2% nos animais sadios, valores ligeiramente inferiores, mas concordantes com Gruber et al. (1985)[8], que encontraram respectivamente 27,5; 5; 29,6 e 8,2%. Nair et al. 1985[13] em animais diarreicos encontraram respectivamente 20,8 e 5,8%. Segundo Skirrow (1981)[17], não mais de 5% dos casos de diarreia humana por *Campylobacter* estão associados a um prévio contato com cães portadores dessa bactéria. Desconhece-se a participação destes animais como fonte de contaminação em nosso meio, mas a alta prevalência do *Campylobacter* encontrado sugere, que eles constituem um importante reservatório destes microrganismos, especialmente em meios de baixo nível sócio-

econômico, onde existe uma estreita convivência, principalmente de crianças, com este tipo de animais.

As aves domésticas comercializadas como alimentos na sua maioria tem espécies de *Campylobacter* em sua microbiota intestinal, Stern (1994)[19] sugere que as aves podem ser uma fonte de infecção em humanos. Praticamente, todos os estudos realizados no exterior tem demonstrado uma alta incidência de *Campylobacter*, em galinhas vivas ou abatidas, adequadas para o consumo humano. A frequência de isolamento (62,2%), encontrada neste trabalho, é concordante com os apresentados pela literatura internacional e nacional, reforçando a importância destas aves como reservatório destas bactérias e possível fonte de contaminação para o homem.

Desta forma, a alimentação humana com produtos avícolas ou com seus derivados ou até mesmo os ovos, podem constituir-se em importante fonte de agente de gastroenterite humana Blaser et al. (1983)[3], Stern (1994)[19], como tem-se verificado pela semelhança em diversos países dos biotipos de *C.jejuni* isolados de humanos e aves Blazer et al. (1979)[2].

**Conclusão:** A frequência de isolamento do *C. jejuni* nos cães foi de 7,9% para animais sadios e 8,9% para os diarreicos. Nas aves o percentual de microrganismos isolados foi de 62,2%. A espécie mais isolada, em todas as oportunidades foi o *C. jejuni*, biotipo 1, excessão aos biotipos das amostras de aves quando isolou-se *C. lari*.

### Referências Bibliográficas:

- 1- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. In: FLEMING, D. O.; RICHARDSON, J. H.; TULIS, J. J.; VESLEY, D. **Laboratory Safety**. Second Ed.. ASM Press. Washington, D.C., 1998, p.293.
- 2- BLASER, M. J.; BERKOWITZ, I. D.; La FORCE, F. M.; CRAVENS, J. RELLER, L. B.; WANG, W. L. *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiological features. **Ann. Intern. Med.**, v. 91, p. 179-85, 1979.
- 3- BLASER, M. J.; TAYLOR, D. N.; FELDMAN, R. A. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. **Epidemiol. Rev.**, v. 5, p. 157-76, 1983.
- 4- FERREIRA, M. C. S.; RIBEIRO, V. L. S.; RICCIARDI, I. D. *Campylobacter* dogs and human enteritis. **Vet. Rec.**, v. 105, p. 451, 1979.
- 5- FLEMING, M. P. Association of *Campylobacter jejuni* with enteritis in dogs and cats. **Vet. Rec.**, v. 113, p. 372-4, 1983.
- 6- FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; GALENO, H.; SOTO, V.; TOLEDO, M. S. Biotypes, serogroups and antibiotic susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chile. **J. Infect.**, v. 20, p.123-7, 1990.
- 7- GALLARDO, F.; GASCON, J.; RUIZ, J.; CORACHAN, M.; JIMENEZ DE ANTA M.; VILA, J. *Campylobacter jejuni* as a cause of traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial susceptibility. **J. Travel. Med.**, v. 5, p.23-6, 1998.
- 8- GRUBER, A.; MÓS, E. N. do; DURIGON, E., L.; NORONHA, A. M. B. Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em fezes normais e diarreicas de cães de São Paulo. **Rev. Microbiol.**, v. 16, p. 287-9, 1985.

- 9- HARIHARAN, H.; WRIGHT, T.; LONG, J. R. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from slaughter hogs. **Microbiologica**, v. 13, p.1-6, 1990.
- 10- JARAMILLO, H. F. **Espécies termófilas de *Campylobacter*: Aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos**. São Paulo, 1983. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina/144p.
- 11- LEVI, A.; RICCIARDI, I. D. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (*C. jejuni*): Isolamento e caracterização de amostras obtidas em galinhas, na cidade do Rio de Janeiro. **Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 332-4, 1982.
- 12- NACHAMKIM, I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7<sup>th</sup> edition. Washington. ASM PRESS. 1999. p. 716.
- 13- NAIR, G. B.; SARKAR, R. K.; CHOWDHURY, S.; PAL, S. C. *Campylobacter* infections in domestic dogs. **Vet. Rec.**, v. 116; p.237-8, 1985.
- 14- RICCIARDI, I. D.; FERREIRA, M. C. S. In: TRABULSI, L. R., ed. **Microbiologia das infecções intestinais**. São Paulo, Atheneu, 1981.
- 15- ROY, C. Infections caused by bacteria of the *Campylobacter* genus. **Med. Clin.**, v. 94, p. 576-8, 1990.
- 16- SIMOR, A. E.; WILCOX, L. Enteritis associated with *Campylobacter laridis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 10-2, 1987.
- 17- SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis* in dogs and cats: a “new” zoonosis. **Vet. Res. Com.**, v. 5, p. 13-9, 1981.
- 18- SKIRROW, M. B.; BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. **J. Clin. Path.**, v. 13, p. 1122, 1980.
- 19- STERN, N.J. Control of *Campylobacter jejuni* in poultry. **Tektran-United States Department of Agriculture**, 1994
- 20- TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. CEBALLOS, S. O.; CANDEIAS, J. A. N. Epidemiology of diarrhoeal diseases in South America. In: Tzipori S. ed. **Infections diarrhoeae in the young**. 1982, p. 121-5.
- 21- ZOTS, R. B.; KLEIN, H.; GOEBEL, H. Serology and culture diagnosis of *Campylobacter jejuni* infections. **Med. Klin.**, v. 85, p. 463-6-1990

Tabela I - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em 344 amostras de animais domésticos

Origem Da amostra	Número de culturas			Porcentagem de positividade
	Positivas	Negativas	Total	
Canína	11	121	132	8,3
Avícola	132	80	212	62,2
Total	143	201	344	70,5

Tabela II - Freqüência de isolamento de espécies termófilas de *Campylobacter* em cães, segundo os grupos estudados

Grupo	Número de culturas			Porcentagem de positividade
	Positivas	Negativas	Total	
Diarréico	5	51	56	8,9
Controle	6	70	76	7,9
Total	11	121	132	8,3

Tabela III - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em cães, segundo as faixas etárias

Faixa etária	Diarréico			Controle		
	Casos	Positivos	%Posit.	Casos	Positivos	%Posit.
< 6 meses	34	4	11,7	31	5	16,1
> 6 meses	22	1	4,5	45	1	2,2
Total	56	5	8,9	76	6	7,9

Tabela IV - Freqüência de isolamento de *Campylobacter* sp termófilos em frangos

Origem da amostra	Idade dias	Número de culturas			Porcentagem de positividade
		positivas	negativas	total	
Avícola	51	53	10	63	84,1
	52	46	31	77	59,7
	50	33	39	72	45,8
Total		132	80	212	62,2

Tabela V- Características biotípicas das amostras termófilas de *Campylobacter* isoladas.

Reações	Organismo	
bioquímicas	<i>C. jejuni</i>	<i>C. lari</i>
Oxidase	positiva	positiva
Catalase	positiva	positiva
H <sub>2</sub> S em papel de acetato de chumbo	positivo	positivo
Hidrólise do hipurato	positiva	negativa
Provas de crescimento		
25°C	não cresce	não cresce
36°C	crece	crece
42°C	crece	crece
Testes outros		
Ácido nalidíxico	sensível	resistente
Cefalotina	resistente	resistente



**Associação da trichomoníase com lesões pré-malignas e malignas do colo uterino**

**Association between trichomoniasis with pre-malign and malignant lesions of the uterine cervix**

**\*Eliete da Costa Silveira**

**\*\*André Tavenard**

**\*\*\*Ediberto Nunes**

**\* Farmacêutica - bioquímica, Especialista em análises clínicas, aluna do curso de Especialização em Citologia Clínica do Centro de Ensino Superior do Pará.**

**\*\* Farmacêutico-bioquímico, aluno do curso de Especialização em Citologia Clínica do Centro de Ensino Superior do Pará.**

**\*\*\* Farmacêutico-bioquímico, Especialista em citologia, Professor da disciplina Citologia do Centro de Ensino Superior do Pará.**

## RESUMO

A Trichomoníase é uma doença que atinge milhões de mulheres em todo o mundo. O carcinoma cervical é a segunda causa de câncer em mulheres. Em virtude da frequente associação entre *Trichomonas vaginalis* e câncer cervical, foi feita uma revisão bibliográfica sobre o assunto a fim de verificar se este parasita é um fator causal ou oportunista de lesões pré-malígnas. Diversos autores foram consultados, sendo que uma das correntes acredita que em casos crônicos, este parasita poderia ser um dos agentes etiológicos de lesões malignas. E em oposição a esta idéia outros pesquisadores acreditam que o tecido lesado favoreça o crescimento do parasita e que no diagnóstico colpocitológico, as alterações celulares causadas por este parasita podem mimetizar lesões pré-malígnas, sendo prudente solicitar a repetição do exame após tratamento para uma melhor avaliação citológica.

Palavras chave: *Trichomonas vaginalis*, trichomoníase, associação, câncer cervical.

## SUMMARY

The Trichomoniasis is a disease that reaches millions of women all over the world. The cervical cancer is the second cancer's cause in women. In virtue of the frequent association between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer, a bibliographical revision was did about the subject to verify if this parasite is a casual factor or a opportunist factor of pre-malign lesions. Some authors were consulted, and a part of then believe in chronicles cases, this parasite could be one of the causal agents of malign lesions. But other researchers, believe that the injured epithelium favors the parasite's growth and that in the colpocitology diagnosis, the cellular alterations caused by this parasite can imitate pre-malign lesions, and is careful to request a repetition of the exam after the treatment to a better cytological evaluation.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, trichomoniasis, association, cervical cancer.

## 1 – INTRODUÇÃO

A vaginite pelo *Trichomonas vaginalis* é uma doença sexualmente transmissível difundida pelo mundo, tanto nos países desenvolvidos como nos sócio-economicamente desfavorecidos. A O. M. S. (1995) estima que dos 333 milhões de casos novos anuais de D.S.T curáveis, cerca de 170 milhões são de trichomoníase. Na maioria dos países industrializados a prevalência de trichomoníase tem diminuído. De maneira geral, 50% das mulheres portadoras de *Trichomonas vaginalis* são assintomáticas e 30% dessas irão desenvolver quadro clínico nos próximos 6 meses.<sup>6</sup>

No menacne, época de maior atividade sexual da mulher, e portanto de maior exposição a agentes sexualmente transmissíveis, há maior risco de infecção por *Trichomonas vaginalis*.<sup>16</sup>

O *Trichomonas vaginalis* não possui a forma cística, apresentando apenas a forma trofozoítica. Em condições normais, o pH

vaginal, encontra-se em torno de 3,8 a 4,5 não sendo propício nesta faixa de pH o desenvolvimento deste parasita. Entretanto, quando ocorre diminuição da acidez com aumento do pH entorno de 5.5 a 5.8, facilita o desenvolvimento do mesmo. Esta variação ocorre antes e durante o período menstrual e gravidez, em função da diminuição dos lactobacilos produtores de ácido láctico.<sup>17</sup>

A presença deste protozoário causa as seguintes alterações em células do epitélio escamoso: edema nuclear de 1,5 a 2 vezes o tamanho normal, picnose, cariorexe, binucleação, excessiva eosinofilia citoplasmática, anofilia, halo perinuclear bem definido, fundo sujo, e aumento na quantidade de células parabasais<sup>17</sup>.

O câncer cervical é a segunda causa de câncer em mulheres no mundo. Estima-se que a incidência em escala mundial seja, cerca de 500.000 casos por ano, sendo a patologia responsável por 15% de todas as neoplasias invasoras diagnosticadas em mulheres.<sup>16</sup>

Os fatores de risco para câncer cervical e seus precursores são, na grande maioria relacionados a atividade sexual. Estes fatores epidemiológicos são conhecidos e incluem: idade precoce a primeira relação sexual, história de múltiplos parceiros, multiparidade, fumo, história de parceiro com doença sexualmente transmissível, fatores imunológicos e deficiência nutricional. (MONSONEGO, 1994)<sup>16,19</sup>.

A associação entre as doenças malignas humanas e os distúrbios inflamatórios crônicos inclui a incidência aumentada em alguns tipos de câncer. O estímulo crônico do crescimento induzido pelos fatores de crescimento liberados pelas células pode ter um papel na carcinogênese destas doenças. Outros fatores possíveis incluem o dano químico ou mutação induzida por radicais livres produzidos pelas células inflamatórias, um agente oncogênico infeccioso ou outros fatores desconhecidos que podem ter levado ao distúrbio inflamatório crônico.<sup>1</sup>

Em estudos epidemiológicos foi retratado o aumento do risco de câncer cervical em mulheres com *Trichomonas vaginalis* em relação as diferenças de tamanho deste parasita, com incidência de parasitas de menor tamanho em carcinoma in situ e invasivo e de maior tamanho em displasias<sup>12</sup>.

É mister ressaltar outrossim que, nesta ampla temática focalizaremos um assunto específico que é a associação entre trichomoníase e lesões pré- malignas e malignas do trato genital feminino.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia utilizada neste estudo parte de uma abordagem interdisciplinar do fenômeno aqui focalizado. Foi feita uma revisão de literatura nas seguintes disciplinas:

Parasitologia: focalizando a morfologia do parasita, habitat, bioquímica, patogenicidade, incidência e transmissão.

Patologia: para maior compreensão entre as lesões no epitélio causada pelo parasita em relação a cronicidade, estado nutricional e comportamento sexual.

Citologia: a presença deste protozoário provoca alterações celulares, por vezes muito acentuadas, evocando uma imagem pré-cancerosa.

Período de pesquisa: Foram revisados artigos e periódicos publicados em revistas especializadas, no período de 1952 a 1999.

Fonte de pesquisa: biblioteca do Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde, onde esta foi realizada via MEDLINE. Foi feito a pesquisa ainda nas seguintes bibliotecas: Universidade Federal do Pará (UFPA) , Universidade Estadual do Pará (UEPA), Hospital Ofir Loyola e Hospital Universitário Barros Barreto.

Idiomas pesquisadas: devido a carência de pesquisas relacionando *Trichomonas vaginalis* e câncer cervical no Brasil, foi necessário abranger outros idiomas, tais como: Inglês, Italiano, Espanhol, Polonês, Servo- Croata e Alemão.

Artigos e revistas especializadas em Análises Clínicas, Ginecologia e Obstetrícia e Doenças sexualmente transmissíveis.

### 3 - OBJETIVO

Verificar, através de revisão bibliográfica, se a presença de *Trichomonas vaginalis* em mulheres com lesões pré-malignas e malignas do trato genital feminino, é um fator causal ou oportunista, visto que pacientes em algumas das fases do câncer cérvico uterino tem uma maior incidência de trichomoníase.

## **4 – RESULTADOS**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

WIELD e KEAN (1956), sugeriram em seus experimentos que tecidos lesados podem funcionar como um importante fator de sobrevivência para o *Trichomonas vaginalis*.

Estudos histológicos da cérvix uterina, durante a cervicite causada pelo parasita, demonstram que ele pode atacar diretamente o epitélio escamoso e que este responde com exagerada vascularidade, seguida de papilite, edema, erosão de camadas superficiais e necrose. A denominada “cérvix em morango” corresponde a observação clínica da marcada distinção dos vasos sanguíneos superficiais e focos hemorrágicos cervicais como é visto no material histológico. Parece, portanto, haver um padrão vascular específico no epitélio escamoso da cérvix durante a infecção por trichomonas.<sup>4,5</sup>

Sua importância está no fato de apresentar manifestações clínicas desconfortáveis e na possibilidade de promover ascensão de patógenos para o trato genital superior e facilitar a infecção pelo vírus HIV, HPV, HSV através das ulcerações do epitélio inflamado.<sup>2</sup>

Clinicamente, a descarga vaginal é homogênea e fétida. A secreção clássica amarela esverdeada e com bolhas é vista em apenas 12 a 34% dos pacientes.<sup>3</sup>

É importante lembrar que na interpretação da colpocitologia os processos inflamatórios crônicos, em média superior a 6 meses, pelo *Trichomonas* modificam o epitélio vaginal com formação de células atípicas, que regridem após tratamento. (KRIEGER et al,1988)<sup>6</sup>

#### 4.1 – Alterações celulares presente na trichomoníase

A associação entre o *Trichomonas vaginalis* e lesões malignas na cérvix uterina, tem sido estudada desde o início dos anos 50. Bechtold e Reicher, sugeriram que este protozoário pode ser responsável pela indução de mudanças na mucosa cervical, denominado como displasia ou carcinoma in situ.

O epitélio escamoso responde à injúria causada pela presença do protozoário através de atipias citológicas que são particularmente notáveis neste caso. Algumas alterações no tamanho do núcleo (1,5 a 2 vezes do normal), binucleação, picnose e cariorexe podem ser observados

em células escamosas.<sup>5,7,8</sup>

Outros fenômenos associados a infestação por trichomonas são:

- Excessiva eosinofilia citoplasmática de células escamosas;
- Halos perinucleares bem definidos;
- Excessiva citólise;
- Marcado incremento na quantidade de células parabasais em mulheres jovens

sugerindo uma falsa atrofia.

- Aumento acentuado de leucócitos polimorfonucleares, no qual os polimorfos rodeiam as células dando uma aparência de “bala de canhão”. Atraídos para o epitélio lesado pelo parasita através de quimiotaxia (movimento direcional) e quimiocinética (movimento não direcional).<sup>9</sup>

Todas as anormalidades referidas sugerem diagnose de infestação por *Trichomonas vaginalis* por um observador experiente, porém, a identificação do parasito é crucial para a emissão de um diagnóstico seguro.<sup>5</sup>

As alterações inflamatórias acentuadas em esfregaço atrófico podem mimetizar lesões pré-cancerosa.<sup>10</sup>

4.2 - O *Trichomonas vaginalis* como fator causal de lesões pré-malígnas e malígnas

Em virtude da frequente associação entre *Trichomonas vaginalis* e câncer cervical, alguns autores acreditam que a trichomoníase em casos crônicos, provoque lesões pré-malignas e malignas na cérvix uterina.

Estudo soro epidemiológico realizado em Singapura, demonstrou uma associação significativa do *Trichomonas vaginalis* e câncer cervical, onde foram registrados uma maior prevalência de anticorpos para este parasita no soro de pacientes com câncer cervical, comparados com pacientes hígidos de controle. Pois, o aumento maior do número de anticorpos reflete uma invasão ativa pelo parasita o qual pode promover malignidade<sup>11</sup>.

O efeito citopático do *Trichomonas vaginalis* é mediado por um contato fechado entre o parasita e a superfície epitelial, este contato libera substâncias, tais como, o fator de separação celular (FSC) e uma variedade de proteinases, as quais são importantes na progressão de carcinomas celulares escamosos e metástases.<sup>11</sup>

Algumas linhagens patogênicas de *Trichomonas* tem sido responsabilizadas em induzir a imuno-supressão isto poderá tornar possível a ativação de vírus carcinogênicos.

A associação entre *Trichomonas vaginalis* e HPV deve ser determinada desde que os riscos relativos com o carcinoma cervical sejam

comparados. De qualquer forma o *Trichomonas* é, meramente, um marcador subordinado da exposição do HPV, influenciado pela vida sexual promíscua, os quais são os principais fatores epidemiológicos encontrados. Após tudo isto uma estreita relação entre a infecção por *Trichomonas vaginalis* e a presença de Papilomavírus humanos tem sido registrados.<sup>11</sup>

Segundo MEISSEL, em uma série de 63.870 pacientes examinados para investigar câncer, encontrou uma correlação entre a presença de *Trichomonas* e atipias celulares. Observou ainda que a incidência de metaplasia escamosa, hiperplasia endocervical, displasia e carcinoma in situ estavam significativamente aumentadas em pacientes com *Trichomonas vaginalis*. Este aumento se observa somente em presença do parasita isolado.

O estudo do tamanho de *Trichomonas vaginalis* em pacientes com displasia e carcinoma da cérvix uterina e em cem casos controles com trocomoníases só mostrou que os parasitas são de um diâmetro significativamente menor em carcinoma in situ (9,57 +/- 0,35 micrômetros) e carcinoma invasivo (10,44 +/- 0,66 micrômetros) que em displasias (13,71 +/- 0,35 micrômetros). A análise da discrepância mostrou que esta diferença é significativa. No grupo controle com parasita isolado o diâmetro de *Trichomonas vaginalis* era duas vezes maior (21,46 +/- 0,66

micrômetros) em carcinoma que na displasia. Isto indica que as formas pequenas de *Trichomonas vaginalis* são mais patogênicos que as maiores e poderia ser um dos agentes causais da transformação atípica do epitélio escamoso da cérvix uterina.<sup>12</sup>

O *Trichomonas* está associado com a imunossupressão humana, com a presença de N-nitrosaminas na região cervical, alta toxicidade nas células cervicais, indução de epitélio atípico na cervix de ratos e promotor de atividade e ou intensificar seus efeitos.<sup>14</sup>

Os resultados de análises combinadas e estudos epidemiológicos sugerem uma relação entre *Trichomonas* e neoplasias. O risco do *Trichomonas vaginalis* para causar neoplasia pode variar de 2 a 4% dos casos dependendo da prevalência da infecção.<sup>14</sup>

4.3 - O *Trichomonas vaginalis* como agente oportunista em lesões pré-malignas e malignas

Segundo KOSS e WOLINSKA apud B.F. et all (1979) expressam a opinião que não exista uma relação causal direta de Trichomoníase e lesões malignas do colo uterino, todavia, é frequente esta associação. É lógico pensar que o tecido lesado venha favorecer o crescimento de *Trichomonas vaginalis*. Quanto ao mecanismo, é sugestivo pensar que a inflamação crônica produzida pelo parasita provoca irritação crônica celular, em particular suscetível a agentes oncogênicos. É certo

que, após o tratamento da inflamação por *Trichomonas vaginalis* as atipias desaparecem.<sup>13</sup>

Esta associação pode ser falsa, desde que a infecção por *Trichomonas* esteja associada a outro patógeno, tal como o HPV, um agente etiológico conhecido de neoplasia cervical.

O parasita por si só, pode causar inflamação e infecção na cérvix, provocando alterações nas células epiteliais, apresentando-se irregulares, maiores, com núcleo hipercromáticos com características malignas encaminhando o diagnóstico para carcinoma in situ erroneamente.<sup>14</sup>

TERZANO, MEZZADRA e ARRIGHI (1956) apud LENCION, L.J. tem chamado atenção sobre a possibilidade de confundir processos de discariose, comuns na trichomoníase, com sinais citológicos de câncer cervical.

Segundo GRIMALDO, é muito comum encontrarmos displasia leve intimamente associadas a processos inflamatórios de natureza e de intensidade variados. De qualquer maneira aconselhamos o tratamento cuidadoso do paciente e a repetição do esfregaço alguns dias depois de terminada a terapia.

E o mesmo autor afirma, que cuidados especiais deverão ser tomados com alterações de contorno nuclear, que também poderão estar

presentes em núcleos benígnos, especialmente quando processos inflamatórios e ou irritativos se encontrarem evidentes. São vistas, muito frequentemente, em núcleo de células basais e para basais benígnas, o que poderá conduzir a um erro diagnóstico de carcinoma in situ. De fato, esta foi uma das causas de alguns relatórios falso positivos de carcinoma in situ, perpetrados a muitos anos nos primórdios da citologia. A maioria desses casos estava associado a marcantes infestações por *Trichomonas*.

Deve ser enfatizado que pacientes em algumas das fases de câncer cérvico uterino, incluindo carcinoma in situ tem uma maior incidência de infestação por trichomonas do que a população normal, que pode ser justificado pelo fato de que a injúria das lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, favorecem o crescimento do parasita tornando possível que a trichomoníase e lesões pré-cancerosas possam coexistir.

O processo de carcinogênese do colo uterino não depende da presença ou ausência de trichomonas, fato este demonstrado em estudos detalhados já realizados.<sup>5,7,8,15</sup>

#### 4.4 – Ação cancerígena da terapêutica usada na trichomoníase

Sobre a associação da terapêutica usada para o trichomoníase com a neoplasia, o metronidazol, droga comumente usada para combater esta infecção, é um importante cancerígeno conhecido como causador de câncer no pulmão e linfomas em ratos. Em pacientes com *Trichomonas*

*vaginalis* uma dosagem de metronidazol foi encontrada induzindo a quebra da molécula de DNA. Em uma pesquisa com 12628 mulheres foi constatado um aumento em relatos de câncer tanto em morbidade quanto mortalidade em pessoas expostas ao metronidazol.<sup>14</sup>

## 5 – DISCUSSÃO

O câncer cervical é a segunda causa de doenças malignas em mulheres no mundo, em torno de 15% de todas as neoplasias. Os fatores de riscos para o câncer cervical e seus precursores são na grande maioria relacionados a atividade sexual.

Em virtude da frequente associação entre câncer cervical e *Trichomonas vaginalis*, alguns autores acreditam que este parasita é um agente causador de uma simples inflamação, outros por sua vez, levantam a possibilidade deste parasita ser um agente etiológico de lesões pré-malignas e possível evolução para câncer cervical.

Mediante esta problemática, observamos que alguns autores concordam com a hipótese de que o *Trichomonas vaginalis* possa ser um agente causador de câncer do colo uterino, tendo em vista ter detectado a presença de anticorpos, do parasita em questão, no soro de pacientes com

câncer cervical; como também fatores de separação celular ( FSC ), que favorecem a evolução do câncer; e a observação de que algumas linhagens com menor tamanho são mais patogênicas, induzindo a imunossupressão e servir de porta de entrada para vírus oncogênicos.

Porém, por outro lado grande maioria dos pesquisadores acreditam ser o tecido com lesões malignas um meio de crescimento que favorece a infecção por *Trichomonas vaginalis*; a intensa inflamação no epitélio vaginal com formação de células atípicas podem mimetizar lesões pré-malignas ; e que a droga utilizada para combater o parasita, o metronidazol, em estudos experimentais em cobaias foi sugerido ser um agente cancerígeno.

Frente a este confronto de idéias tão opostas, fica claro que há necessidade de maiores pesquisas para esclarecer melhor esta possível relação entre *Trichomonas vaginalis* e câncer cérvico-uterino.

## 6 - CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos por meio de revisão bibliográfica, podemos evidenciar que a frequente coexistência de *Trichomonas vaginalis* com as lesões cervicais pré-malignas e malignas, tem causado muitas especulações interessantes sobre uma possível relação de causa ou efeito, visto que, a detecção de anticorpos do parasita em pacientes portadoras de câncer cervical é elevada, o que vem a ser um indício que as lesões podem ter sido provocada pelo parasita.

E por outro lado, foi observado que o tecido lesado pode funcionar como um importante fator de sobrevivência para o *Trichomonas vaginalis*, favorecendo o crescimento deste parasita e conseqüentemente sua elevada presença em mulheres com câncer cervical.

Diante do exposto, consideramos que quando as alterações celulares acentuadas, com a presença deste parasita, evocam lesões pré-malignas, seria prudente sugerir um novo exame após tratamento para melhor avaliação citológica.

Esta pesquisa não esgota qualquer questão. Muito pelo contrário. Estudos futuros são necessários para elucidar a epidemiologia do *Trichomonas vaginalis*, a etiologia mais precisa e os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical em mulheres HPV negativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – HENRY, J.B. - **Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**: 18. ed. São Paulo, Manole, 1995.
- 2 – JUNIOR, W.B. - **Doenças sexualmente transmissíveis**: Atheneu , 2000.
- 3 – SCHECHTER, M. & MARANGRI, D.V. - **Doenças infecciosas e conduta diagnóstica e terapêutica**: Guanabara Koogan, 1998.
- 4 – KOLISTAD, P. - **The colposcopic picture of *Trichomonas vaginalis***: *Acta Obstet Gynecol scand* 43: 388-98, 1964.
- 5 – KOSS, L.G. - **Diagnostic cytology and its histopathologic bases**: 4. ed. Philadelphia, lippincott- a ed. Philadelphia, Lippincott-aven., 1: 345-47, 1992.
- 6 – PORTO, A.G.M. - **Infecções sexualmente transmissíveis na gravidez**: Atheneu, 2000.
- 7 – BONFIGLIO, T.A. & EROZAN, Y.S. - **Gynecologic cytopathology**: Philadelphia, Lippincott-Raven. 1997.
- 8 – KOSS, L.G. & GOMPEL, C. - **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**: São Paulo, Manole, 1997.

9 – MASSON, P.R. & FORMAM, L. - **Polymorphonuclear cell chemotaxis to secretions of pathogenic and nonpathogenic *Trichomonas vaginalis***: *J. Parasitol*, 1982.

10 – BECHTOLD, E. & REICHER, N. B. - **Relationship of trichomonas infestations to false diagnoses of squamous carcinoma of cervix**: *Câncer*, 1952.

11 – YAP, E.H. , HO, T.H. & CHAM, Y.C. - **Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patientes**: *Genitourin Med*, 1995.

12 – MEKKI, F. & IVIC, J. - **Significance of variations in the size of *Trichomonas vaginalis* in patientes with dysplasia intraepithelial and invasi planocellular carcinoma of the uterine cervix**: *Jugosl Ginekol Opstet*, 1979.

13 – FEDI, B. ett all. - **Considerazione sull associazione tra il *Trichomonas vaginalis* e alcuni tipi di lesione del collo uterino in base ai dati raccolti nel quinquennio 1974 – 1978**: *Bollettino Societa Italiana Biologia sperimentale*, 1979.

14 – ZHANG, Z.F. & BEGG, C.B. - **Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Resultes from a combined analysis of 24 studies**: *Int j. Epidemiol*, 1994.

15 – KOSS, L.G. & WOLINSKA, W.H. - ***Trichomonas vaginalis* cervicitis and its relationships**: *Cancer*, 1959.

16 – PARELLADA, C. I. , PEREYRA, E. A.G. - **Fatores de risco para câncer cervical e seus precursores**: *Revista Brasileira de Colposcopia*, 1998.

17 – CONSOLARU, M.E.L. , SUZUKI, L.E. & MARQUES, E.B.A. - **Estudo da Tricomoniase e a sua abordagem no diagnóstico colpocitológico**: *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, vol. 31(1): 25-28, 1999.

18 – SCHNEIDER, M.L. & SCHNEIDER, V. - **Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica**: Rio de Janeiro, Revinter, 1998.

- 19 – MONSONEGO, J. - **Spontaneous screening of cervical cancer: facts and arguments. Screening of cervical cancer, for whom, why and how?** Experts Conference. 2.ed. International Congress of Papilomavirus in Human Pathology. Unesco, Paris, 1994.
- 20 – BRITO, M.V.H. - **Medicina manual do trabalho de conclusão de curso - TCC.** CCBS – UEPA, 1.ed. Belém, 1998.
- 21 – KURMAN, R.J. & SOLOMOM, D.O. - **Sistema bethesda para o relato de diagnóstico citológico cervicovaginal:** Rio de Janeiro. Revinter, 1997.
- 22 – HUSAIN, O.A.N. & BUTLER, E.B. - **Atlas colorido de citologia ginecológica:** São Paulo. Artes Médicas, 1995.
- 23 – NEVES, D. P. & Colls. - **Parasitologia humana:** Atheneu, 1995
- 24 – ROBBINS, C. & KUMAR. - **Patologia estrutural e funcional.** 5. Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1996.

## CONTATO

Nome: Eliete da Costa Silveira

E-mail: [silver@nautilus.com.br](mailto:silver@nautilus.com.br)

Fax: 0xx 91 231-0150

Fone: 0xx 91 231-5770

Endereço: Conjunto Médice II, rua abaetetuba, número 144.

Marambaia- Belém- PA CEP: 66620-030

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS LEUCEMIAS MIELÓIDE  
AGUDA ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO (\*)**

**IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF THE ACUTE MYELOID  
LEUKEMIA BY FLOW CYTOMETRY (\*)**

*Janaina Cristiana de Oliveira Crispim <sup>(1)</sup>; Carla Kaline Fernandes Câmara <sup>(1)</sup>; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca <sup>(2)</sup>; Aldair de Souza Paiva <sup>(2)</sup>; Francisco Fernandes do Nascimento Júnior <sup>(2)</sup>; Maria Zélia Fernandes <sup>(2)</sup>; Maria Cleide de Araújo Lopes <sup>(3)</sup>; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva <sup>(4)</sup>; Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior <sup>(5)</sup>.*

(\*) Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN) para elaboração de monografia de conclusão do Curso de Farmácia, habilitação de Farmacêutico-Bioquímico / Analista Clínico.

(1) Alunas concluintes do Curso de Farmácia, Habilitação de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN; (2) Médicos Hematologistas do Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IOHN), (3) Farmacêutica-Bioquímica do Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IOHN); (4) Bolsista de iniciação científica da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT / UFRN; (5) Prof. Assistente da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT / UFRN

**Endereço Para Correspondência:** *Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.*

Disciplina de Imunologia Clínica - DACT, Faculdade de Farmácia - CCS / UFRN.

Rua Gal Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Petrópolis, Natal-RN.

E-mail: gbcj@ufrnet.ufrn.br

**RESUMO:**

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** Embora a citomorfologia ainda seja importante no diagnóstico das leucemias mielóide aguda (LMA), a imunofenotipagem têm se tornado essencial no diagnóstico e acompanhamento destas neoplasias. Dentre estes métodos, citometria de fluxo tem se destacado como metodologia moderna, apresentando-se caracteristicamente como método de análise multiparamétrica e quantitativa de células sanguíneas normais e leucêmicas. O objetivo deste trabalho foi de realizar um estudo retrospectivo de imunofenotipagem em 38 casos de LMA.

**METODOLOGIA:** A Imunofenotipagem foi realizada em células blásticas por citometria de fluxo com um painel de anticorpos monoclonais específico para leucemias agudas constituído de: CD13, CD33, CD34, CD45, CD14, CD7, CD3, CD4, CD8, CD19, CD10, HLADR e IgM. Os parâmetros hematológicos foram obtidos em contadores hematológicos e a citomorfologia em distensões sanguíneas e de medula óssea coradas pelo leishmann. Paralelamente também foram obtidas informações referentes aos doentes tais como, idade e sexo bem como dados clínicos relacionados à doença. **RESULTADOS:** Dos 38 indivíduos analisados, 23 casos eram do sexo masculino e 15 do sexo feminino. Em relação a faixa etária constatou-se um maior número de casos em adultos. Com relação a dados clínicos, observou-se que a hepatomegalia e a esplenomegalia estiveram presentes na maioria dos casos com 87.5%, e 50% dos casos respectivamente. A imunofenotipagem demonstrou um perfil característico de LMA com expressão de CD13/CD33 em todos os casos, o CD34 na maioria dos casos. O CD14 foi reativo nas leucemias monocíticas, tendo sido também observado negatividade aos antígenos linfóides como o CD19, CD10 e CD3, com exceção do CD7 que esteve presente em 5 casos. Em relação a citomorfologia, observou-se uma correlação direta entre a citomorfologia e a classificação FAB, havendo um predomínio do tipo mielo-monocítica (LMA-M4) que correspondeu 41,7% dos casos. **CONCLUSÕES:** Estes dados demonstram a importância da imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das LMA bem como no acompanhamento destas neoplasias.

**Palavras Chaves:** Imunofenotipagem; Leucemia Mielóide Aguda; Citometria de Fluxo

**ABSTRACT:**

**INTRODUCTION AND OBJECTIVE:** Although the cytomorphology and cytochemistry are important in the diagnosis of the acute myeloid leukemia (AML), the immunophenotyping has been turned essential in the diagnosis and accompaniment of these neoplasie. The flow cytometry it's a modern methodology, to presenting characteristically as method of multiparametric analyzes and quantitative of normal or leukemic blood cells. The object of this work was of accomplishing a retrospective study of immunophenotyping in 38 cases of AML. **METHODOLOGY:** The immunophenotyping was accomplished by the flow cytometry with a panel of monoclonal antibodies specific to acute leukemia as: CD13, CD33, CD34, CD45, CD14, CD7, CD3, CD4, CD8, CD19, CD10, HLADR and IgM. The hematological parameters was accomplished by hematological analyzer and the cytomorphology in blood and bony morrou films stained by the leishmann. In parallel also they were obtained information referents to the patients such as, age and sex as well as clinical data related to the disease. **RESULTS:** The results showed that 23 patients ware male and 15 female. In relation to the age, a large number of cases was verified in adults. The relation of the clinical data was observed that the hepatomegaly and the esplenomegaly were respectively present in most of the cases with 87.5%, and 50% of the cases. The immunophenotyping showed a characteristic profile of AML with expression of CD13/CD33 in all cases, the CD34 was presented in most of the cases and the CD14 was reagent in all cases of the monocytic leukemia, having also been observed absence to the lymphoid antigens as the CD19, CD10 and CD3, except the CD7 that it was present in 5 cases. In relation to cytomorphology, a direct correlation was observed between of the FAB classification and immunophenotyping having a prevalence of the type mielo-monocitic (AML-M4) that corresponded 41,7% of the cases. **CONCLUSIONS:** These data demonstrate the importance of the immunophenotyping in the differential diagnosis of AML as well as in the accompaniment of these neoplasies.

**Key Word:** Immunophenotyping; Acute Myeloid Leukemia; Flow Cytometry.

## 1) INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:

Embora ainda hoje a classificação da leucemias agudas seja baseada essencialmente na citomorfologia em distensões sangüíneas e de medula óssea coradas com corantes hematológicos e em provas citoquímicas, novas metodologias como a citogenética, a biologia molecular e principalmente a imunofenotipagem tem sido largamente empregadas trazendo informações importantes para o diagnóstico, prognóstico e a terapêutica destas neoplasias hematológicas <sup>(1-4)</sup>.

A finalidade da classificação morfológica é de separar as leucemias mielóides das linfóides, principalmente quando os blastos apresentarem pouca ou nenhuma diferenciação celular <sup>(1-4)</sup>.

O grupo FAB (*French American British*) classificou as leucemias mielóides agudas (LMA) e linfóides agudas (LLA) em subtipos de acordo com as características morfológicas em distensões de medula óssea e / ou de sangue periférico corados por corantes hematológicos. Este grupo estabeleceu critérios de classificação baseado em scores quanto a relação de tamanho do núcleo, citoplasma, presença de nucléolos, regularidade de membrana nuclear, características tintoriais do núcleo e citoplasma, bem como a presença de vacúolos, granulações intracitoplasmáticas e bastonetes de Auer <sup>(5-6)</sup>.

Aliada a morfologia, métodos citoquímicos têm contribuído para caracterizar e diferenciar linhagens celulares leucêmicas. Estas técnicas partem do princípio de que determinadas substâncias intracitoplasmáticas presentes em linhagens celulares distintas poderiam servir para a caracterização de células leucêmicas, em particular, as formas mais indiferenciadas. Desta forma, a coloração para *mieloperoxidase* (MPO) e/ou *negro de sudan* tem se mostrado úteis na caracterização de células leucêmicas provenientes de leucemias agudas, sendo a sua positividade forte indicativo de leucemia mielóide aguda (LMA) <sup>(5-6)</sup>.

A classificação FAB pretendeu dar uniformidade à nomenclatura das leucemias agudas, estabelecendo padrões a serem seguidos, desde as formas com blastos indiferenciados, até aqueles com elementos mais maduros. Desta forma, a classificação das LMA foi definida em M1 até M6 e as LLA em L1, L2 e L3 <sup>(5-6)</sup>.

Em 1985 os mesmos autores atualizaram a classificação FAB e acrescentaram a categoria M7 (megacarioblástica) aos já seis grupos conhecidos <sup>(7)</sup>.

Em 1990 o mesmo grupo descreveu a LMA-M0, tão indiferenciada que só é possível caracterizá-la usando a imunofenotipagem como diagnóstico <sup>(8)</sup>.

Os critérios imunológicos por sua vez são baseados na expressão de antígenos de diferenciação celular das distintas linhagens graças ao emprego de anticorpos monoclonais (AcMo) que tem possibilitado caracterizar estas células conforme a sua expressão antigênica. Além disso, sabendo-se que ao longo da diferenciação celular várias moléculas são perdidas ou adquiridas, diversos pesquisadores têm demonstrado que as leucemias representam na verdade um grupo heterogêneo de doenças, permitindo desta forma, através de painéis de AcMo a identificação com precisão, qual a linhagem celular e em que nível de diferenciação se encontra o processo leucêmico <sup>(1-6)</sup>.

Atualmente graças ao emprego dos AcMo conjugados a fluorocromos têm sido possível a utilização de métodos mais precisos de marcação como a citometria de fluxo que veio substituir com vantagem a microscopia de fluorescência convencional <sup>(1)</sup>.

O estudo imunofenotípico das leucemias por citometria de fluxo está baseado na identificação de um ou mais antígenos na superfície ou intracelular de células em suspensão. Além da caracterização quanto à expressão destes marcadores, a refração do feixe luminoso do raio laser também fornece informações importantes quanto ao tamanho celular (*Forward Scatter* – FSC) e a complexidade ou granulosidade interna (*Side Scatter* – SSC) <sup>(9)</sup>.

O uso sistemático da imunofenotipagem nas LMAs tem importância conjuntamente com a classificação FAB na identificação de células leucêmicas com ou sem diferenciação celular. Desta forma, vários AcMo são utilizados na caracterização destas leucemias, tais como o CD33, CD13 e o CD14 além de anticorpos anti mieloperoxidase (anti – MPO) <sup>(4-6)</sup>.

A identificação imunológica de casos de LMA com blastos muito imaturos é de grande valor no diagnóstico diferencial entre a LLA, do tipo L2 da classificação FAB com os subtipos M0 / M1 das LMAs. Desta forma, o CD13 e / ou CD33 e principalmente AcMo anti-MPO versus ausência de antígenos linfóides são os elementos que melhor definem estes tipos de leucemias agudas. Assim sendo, a maior contribuição destes AcMo específicos para a linhagem mielóide tem sido no que se refere ao diagnóstico da LMA-M0 pois até recentemente estes casos eram tidos como leucemias indiferenciadas e tratadas como LLA <sup>(8-10)</sup>.

Além destes exemplos, AcMo direcionados a glicoproteínas plaquetárias tornaram possível o diagnóstico das leucemias megacariocitárias (M7) sem necessidade de recorrer a análises citoquímicas e / ou ultraestrutural por microscopia eletrônica <sup>(7,9,10)</sup>.

Para a caracterização dos demais subtipos FAB das LMAs a imunofenotipagem é menos importante porém corrobora com os achados morfológicos e citoquímicos na definição de diagnóstico (tabela 2). A expressão de pelo menos 2 antígenos mielóides como o CD33, CD13 ou MPO caracteriza a linhagem mielóide sob ponto de vista imunológico <sup>(11-15)</sup>.

Desta forma, os casos de LMA - M3 (promielocítica) são caracterizadas pela expressão de antígenos mielóides associados a ausência de HLADR e do CD34 <sup>(10,15)</sup>. A expressão de antígenos monocitários como o CD14 e CD15 mostram-se presentes na população monocitária, caracterizando a leucemias monocíticas (M4 e M5). E finalmente, a eritroleucemia (M6 da classificação FAB) se caracteriza pela expressão da *glicoforina alfa* na população eritrocitária destas leucemias <sup>(10,15)</sup>.

O objetivo deste trabalho é investigar um grupo de indivíduos portadores de LMA baseado em critérios morfológicos e de imunofenotipagem, procurando também correlacionar estes dados com outros parâmetros tais como a leucometria, contagem de plaquetas dosagem de hemoglobina, e classificação morfológica, bem como dados clínicos relacionados a leucemias agudas tais como a hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, cloroma, anemia, etc.

## **2) CASUÍSTICA E METODOLOGIA:**

### **2.1) CASUÍSTICA:**

Foram analisados células blásticas provenientes de 38 portadores de leucemia mielóide aguda antes de qualquer intervenção terapêutica.

A avaliação clínica foi realizado pelo médico responsável, levando-se em conta a presença sinais clínicos relacionados a doença tais como: linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia gengival, tendo sido também registrado dados laboratoriais freqüentemente associados a leucemias agudas tais como anemia, trombocitopenia, leucocitose e presença de células blásticas no sangue periférico.

Considerou-se linfadenopatia generalizada quando os linfonodos mediam mais que 2cm de diâmetro e pertenciam a mais de uma cadeia regional não contígua. A hepatomegalia foi determinada quando o fígado media mais que 3cm abaixo do rebordo costal direito. A esplenomegalia por sua vez foi determinada quando o baço media mais que 3cm do rebordo costal esquerdo.

A anemia foi determinada pela presença de níveis de hemoglobina menor que 13g/dl nos homens e 12g/dl nas mulheres, segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde <sup>(16)</sup> e a trombocitopenia quando a contagem de plaquetas estava inferior a 150.000/mm<sup>3</sup>.

## 2.2) METODOLOGIA:

### A) Exames Hematológicos:

Para o diagnóstico laboratorial das leucemias agudas seguiu-se o critério de observação da presença de mais que 20% de células blásticas no aspirado de medula óssea, cuja avaliação morfológica seguiu os critérios da classificação FAB<sup>(5-8)</sup>.

O sangue periférico dos pacientes foi coletado em frascos do tipo “vacutainer” com EDTA potássico para hemograma rotineiro. A leucometria, contagem de plaquetas e dosagem de hemoglobina foram determinadas em analisador hematológico (Cell - Dyn 3000) e a contagem diferencial de leucócitos em distensões de sangue periférico após coloração pelo leishmann.

### B) Imunofenotipagem:

A imunofenotipagem foi realizada com um painel de AcMo marcados com fluorocromos como o *isotiocianato de fluoresceína* (FICT) e / ou *phicoeritrina* (PE), com especificidade para leucemias agudas conforme mostra o quadro 2.

Para análise de sangue periférico, utilizou-se a mesma amostra colhida para o hemograma. Quando o material analisado foi medula óssea, utilizou-se para tal, aspirado de mielograma em seringa previamente heparinizada (*Liquemine-Roche*).

A reação de imunofluorescência foi realizada em 100 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de suspensão de celular previamente homogeneizada, as quais foram incubadas com 20  $\mu\text{L}$  de AcMo específico por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi homogeneizada e acrescentada à mesma cerca de 2 mililitros (mL) de solução de lise (*Lysing Solution - Becton Dickinson*), havendo nova incubação por mais 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 rotações por minutos (rpm), o sobrenadante desprezado e o sedimento resuspenso em solução salina

tamponada com fosfatos (PBS) e novamente centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo esta última etapa realizada mais 2 vezes consecutivas. Ao fim deste período, o sedimento foi então ressuspenso em 1 mL de solução de formaldeído a 1% em PBS. Em todos os casos analisados, utilizou-se um controle de autofluorescência inespecífica com um conjugado IgG duplamente conjugado ao FICT e PE.

A análise foi realizada em um citômetro de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Analyser - Facs-can da Becton Dickinson, San-Jose, Ca, USA*), utilizando-se o programa lysys II, com aquisição de 10.000 eventos, levando-se em conta os parâmetros FSC e SSC em escala linear, bem como FL1 e FL2 em escala logarítmica que detectam a fluorescência verde e laranja ou seja a reação antígeno anticorpo conjugado ao FICT e PE respectivamente.

As imunofenotipagens foram consideradas positivas quando ocorreram mais que 20% de células blásticas positivas para a maioria dos AcMo. No caso de marcadores de células progenitoras como o CD34 por ser muito específico a reação foi considerada positiva quando o número de células marcadas foi igual ou superior a 10%.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas em percentagens da população celular com reação positiva ou negativa e intensidade de fluorescência, conforme nos mostra as figuras 2 e 3.

## **RESULTADOS:**

### **A) Características Gerais dos Pacientes:**

Dos pacientes estudados, 23 (60,5%) eram do sexo masculino e 15 (39,5%) do sexo feminino. A idade do grupo analisado variou de 11 a 82 anos. As faixas etárias mais acometidas pela doença foi a do grupo com idade superior a 50 anos com 18 casos (47,4%), seguido pela faixa etária compreendida entre 30 a 40 anos com 8 casos (21%). Os outros grupos de outras faixas etárias estiveram presentes porém com um menor número de casos como indivíduos com idade inferior a 20 anos com 6 casos (15,85) dos

casos e por último, as faixas etárias compreendidas entre 20 a 30 anos e 41 a 50 anos, os quais constituíram de 3 casos 97,9%) cada um.

### **B) Aspectos Clínicos:**

Sinais clínicos relacionados com a doença estiveram presentes na maioria dos casos. Destes, a hepatomegalia predominou no grupo analisado com 24 casos (63,2%), seguida pela esplenomegalia e pela hipertrofia gengival com 15 (39,5%) e 5 (13,2%) dos casos respectivamente, independente da imunofenotipagem e classificação FAB, com exceção da hipertrofia gengival que mostrou-se mais freqüente nas leucemias monocíticas.

### **C) Dados Laboratoriais:**

Na tabela 05 encontram-se resumidas os principais dados laboratoriais dos pacientes estudados, tais como contagem de plaquetas, leucometria, dosagem de hemoglobina e diferencial de leucócitos dos pacientes no momento do diagnóstico.

Vinte e sete indivíduos (71,1%) apresentaram leucocitose no momento do diagnóstico, cujas leucometrias variaram entre 14.000 a 299.000/mm<sup>3</sup>, 10 casos (26,3%) apresentaram leucometria dentro dos limites de normalidade (5.000 a 10.000/mm<sup>3</sup>) e 1 caso (2,6%) apresentou-se leucopênico com contagem de 900 leucócitos/mm<sup>3</sup>.

A anemia, determinada pela dosagem de hemoglobina foi observada em 30 casos (78,9%) e a plaquetopenia em 24 casos (63,1), as quais foram mais acentuadas nos casos de leucemia promielocítica, que apresentaram fenômenos hemorrágicos mais evidentes na ocasião do diagnóstico (tabela 05).

#### **D) Imunofenotipagem e Classificação FAB:**

A imunofenotipagem demonstrou um perfil imunofenotípico característico de leucemia mielóide aguda, com a expressão de antígenos mielóides (CD13/CD33) e todos os casos analisados. A expressão do marcador para células progenitoras (CD34) mostrou-se presente na maioria dos casos, caracterizando a presença de precursores mielóides com pouca ou nenhuma diferenciação celular (CD34+/CD13+/CD33+), estando este perfil mais presente nas LMA do tipo M1 e M2 da classificação FAB.

Os casos de leucemias promielocíticas apresentaram um perfil imunofenotípico característico com expressão de CD13 e CD33, sendo negativo ao CD34 e ao HLADR.

Nas leucemias monocíticas, observou-se a expressão de antígenos relacionados a esta linhagem (CD14), concomitante com a expressão de marcadores mielóides (CD13/CD33), sugerindo uma diferenciação monocítica as quais se identificaram com os subtipos morfológicos M4 e M5 da classificação FAB.

A eritroleucemia, teve o seu componente eritrocitário caracterizado unicamente através da citomorfologia, visto que não dispomos no momento de AcMo específico para antígenos desta linhagem celular.

Marcadores linfóides empregados neste estudo, tais como o CD10, CD3, CD8, CD19 e sIgM estiveram ausentes em todos os casos analisados, havendo reatividade ao CD7 e ao CD4 em alguns casos. O CD7 é uma glicoproteína de peso molecular de 40 Kda e representa antígeno de membrana associado a células T. Nestas células, sua expressão precede o rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR), mostrando que pode ser um antígeno presente em células progenitoras. Embora sua função como molécula de adesão ainda não esteja bem esclarecida, acredita-se que ela desempenhe um papel importante na adesão e ativação das células T. Alguns autores entretanto acreditam que a expressão deste antígeno em células progenitoras estaria relacionada na mediação da migração destas células da

medula óssea ao timo. Recentemente este antígeno foi identificado em células progenitoras que podem dar origem a outras linhagens celulares, podendo desta forma ser observada em algumas LMA muito imaturas, fato este constatado neste trabalho <sup>(17-19)</sup>.

## **DISCUSSÃO:**

O diagnóstico e a classificação das leucemias agudas estão classicamente baseados em critérios morfológicos e citoquímicos. Atualmente, a imunofenotipagem tem sido introduzida na rotina laboratorial visando uma melhor precisão diagnóstica <sup>(9,19-22)</sup>.

A investigação inicial fundamenta-se nos critérios citomorfológicos associados às reações citoquímicas clássicas: MPO, Negro de Sudan, Reação do Ácido Periódico de Schiff e Colorações para Esterases. Os linfoblastos normalmente não exibem grânulos citoplasmáticos na coloração de Romanovsky e não apresentam reatividade a enzima mieloperoxidase (MPO) quer na reação citoquímica ou na imunofenotipagem com AcMo anti MPO, apresentando também reação negativa ao Negro de Sudan <sup>(1)</sup>.

A LMA foi inicialmente classificada em 9 subgrupos (tabela 2), sendo importante destacar a inclusão dos subtipos M0 e M7 cuja imunofenotipagem cumpre um papel fundamental. O subtipo FAB-M0 não apresenta a enzima MPO detectável pela citoquímica convencional, não expressa antígenos linfóides, mas são geralmente CD13/CD33 positivos além de expressarem MPO intracitoplasmática detectada pela imunofenotipagem. A leucemia megacariocitária (FAB-M7) por sua vez, não possui critério morfológico bem definido (embora as vezes apresentem projeções citoplasmáticas), sendo identificável através de antígenos específicos como as glicoproteínas plaquetárias (CD41, CD42 e CD61) <sup>(1,10,15)</sup>.

As formas mielomonocíticas e monocíticas têm padrão imunofenotípico próprio com reatividade a antígenos monócitos relacionados como o CD14 e CD11, correlacionado-se com a citomorfologia (classificação FAB), fato este

observado neste trabalho, onde o CD14 foi fortemente positivo na população monocítica na análise pela citometria de fluxo <sup>(10,15)</sup>.

O HLADR por sua vez mostra-se presente na maioria dos casos de LMA, com exceção das leucemias promielocíticas, fato este constatado neste estudo.

A respeito da correlação antigênica com a citomorfologia, observou-se uma correlação direta da classificação FAB e a imunofenotipagem em todas as leucemias estudadas, corroborando-se estes achados com os dados da literatura os quais relacionam diretamente a imunofenotipagem das LMA com a classificação morfológica <sup>(1,10,15)</sup>.

Finalmente é importante ressaltar a importância da expressão aberrante de antígenos linfóides (CD19, CD2 e CD7) em blastos mielóides em alguns casos de LMA, havendo relatos da correlação destes achados com anormalidades citogenéticas específicas tais como a expressão do CD19 em LMA-M2 com translocação 8-21 t(8,21) e o CD2 que pode se expressar na LMA-M4 com eosinofilia (M4/Eo) que apresentam a inversão do cromossomo 16 (c/inv 16) <sup>(1,10,15)</sup>. Neste estudo entretanto constatou-se a apenas a expressão anormal do CD7 em cinco casos, os quais também expressavam fortemente o CD34, caracterizando portanto leucemias muito imaturas.

Em relação aos dados laboratoriais, observou-se que a plaquetopenia, associada a leucocitose as custas de blastos e a anemia estiveram presentes na maioria dos casos, confirmando a famosa tríade leucêmica das leucemias agudas (anemia; fenômenos hemorrágicos e tendência a infecções) <sup>(23)</sup>.

## **CONCLUSÕES:**

1) O emprego sistemático de anticorpos monoclonais tem sido útil no diagnóstico diferencial deste grupo de leucemias agudas, em particular nos subgrupos com pouca ou nenhuma diferenciação celular.

2) A expressão de antígenos mielóides como o CD33 e CD13 associados na maioria dos casos ao CD34 caracterizou imunofenotipicamente a presença de precursores mielóides muito imaturos.

3) O subtipo morfológico mielomonocítico foi o mais freqüentemente observado, os quais se correlacionaram com a imunofenotipagem com forte expressão do CD14 na população monocitária.

4) Dados laboratoriais como plaquetopenia, baixo níveis de hemoglobina e leucocitose com elevada contagem de elementos imaturos no sangue periférico estiveram presentes na maioria dos casos.

5) Dados clínicos relacionados a leucemias tais como hepatoesplenomegalia estiveram presentes na maioria dos casos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1) **ZAGO, M.A. and COVAS, L.T.** - Leucemias, diagnósticos e tratamento. (Série De Monografias) *Escola Brasileira de Hematologia & Colégio Brasileiro de Hematologia*: 1-32, 1993.

2) **TAYLOR, C.G.; STASI, R., BASTIANELLI, C. et al** - Diagnosis and classification of the acute leukemias: recent advances and controversial issues. *Hematopathology and Molecular Hematology*, 10: 1-38, 1996.

3) **CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.; CIUVALSCHI MAIA, R.; ALMEIDA DOBBIN, J.; KADMA CARRIÇO, M.; CABRAL HARAB, R.; SAVINO, W. and POMBO DE OLIVEIRA, M.S.** - Importância da aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 29 (3): 159-167, 1997.

4) **LORENZI, T.F. and JAMRA, M.** - Hemopatias malignas: da morfologia à biologia molecular. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2 (3): 6-17,1997.

5) **BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. and SULTAN, C.** – Proposal for the Classification of the acute leukemias. *British Journal of Haematology*. 33: 451-458,1976.

6) **BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. and SULTAN, C.** - The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *British Journal of Haematology*. 47: 553-561, 1981.

7) BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. and SULTAN, C. – Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7) .*Annals of Internal Medicine*, 103: 460-462,1985.

8) BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. and SULTAN, C. – Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 103: 620-629,1990.

9) RUIZ-ARGUELLES, A. - Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Clinica Chemica Acta*, 211:13-27;1992.

10) JENNING, C.D. and FOON, A. - Recent advances in flow cytometry application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 90 (8): 2863-2892,1997.

11) RAEBEL, C.B.; CASTILLO COFIÑO, R. BRICHS L.F.; PERET, P.P.; VIVES CORRONS, J.L. and CASAS, S.W. in *Hematologia Clínica*, cap 19, pag 203-319, Editora Mosby / Doyma Libros, 1994.

12) EDWARD,S.H. and LISTER, T.A. in: *Leukemia*, 5ª Edição, cap 4, pag, 42, editora W.B. Sauders Company, 1990.

13) POMBO DE OLIVEIRA, M. S. and TABAK, D. G. -The significance of phenotyping leukemias using monoclonal antibodies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*: 763-772,1990.

14) NEAME, P.B.; SOAMBOONSRUP, P.; QUIGLEY, J.G. and PEWARCHUCK, W. – The use of monoclonal antibodies and immune markers

in the diagnosis, prognosis, and therapy of acute leukemia. *Transfusion Medicine Reviews*, vol VIII (1), january: 59-75, 1994.

**15) MATUTES, E.** - Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies. *Journal of Clinical Pathology* 48: 194-197, 1995.

**16) WHO** ( World Health Organization ) *TECHNICAL REPORT SERIES*, N° 405,1968.

**17) FREEDMAN, A.S. and NADLER, L.M.** - Cell surface markes in hematologic malignancies. *Seminars in Oncology*,14 (2):193-212, 1987.

**18) FOON, K. A. and TODD, R. F.-** Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 68 (1): 1-31,1986.

**19) RIBEIRO, R.C.; CORDOBA, J.C. and PUI, C.** - Fatores prognósticos na leucemia linfoblástica aguda na criança. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 14: 252-261,1992.

**20) DREXLER, H.G.; GIGNAC, S M. and MINOWAD, J.** - Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Review article. *Blut*: 227-339, 1988.

**21) PUI, C.; BEHM, F.G.; CRIST, W.M.** - Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. Review article. *Blood*, 82 (2): 343 - 362, 1993.

**22) FARAHAT, N.; VAN DER PLAS, D.; PRAXEDES, M.; MORILLA, R.; MATUTES, E. and CATOVSKY, D.** - Demonstration of cytoplasmic and

nuclear antigens in acute leukaemia using flow cytometry. *Journal of Clinical Pathology*, 47: 843-849, 1994.

**23) JANRA, M. and FERREIRA LORENZI, T.** in: *Leucócitos Leucemias e Linfomas* , cap 1, pag: 48-70, Editora Guanabara Koogan, 1986.

Tabela 01:  
Classificação FAB\* das leucemias Agudas

<b>Leucemia Linfóide Aguda (LLA)</b>	
<b>L1</b>	Leucemia linfóide de blastos pequenos e homogêneos.
<b>L2</b>	Leucemia linfóide de blastos de tamanho variável e heterogêneos.
<b>L3</b>	Leucemia linfóide de blastos grandes com citoplasma vacuolados.
<b>Leucemia Mielóide Aguda (LMA)</b>	
<b>M0</b>	Leucemia Aguda Inclassificada (AcMo anti MPO+)
<b>M1</b>	Leucemia mielóide de blastos indiferenciados
<b>M2</b>	Leucemia mielóide típica de blastos diferenciados (pmc e mb)
<b>M3</b>	Leucemia promielocítica hipergranular.
<b>M3v</b>	Leucemia promielocítica hipogranular.
<b>M4</b>	Leucemia mielo-monocítica.
<b>M5a</b>	Leucemia monoblástica.
<b>M5b</b>	Leucemia monocítica (promonócitos e monoblastos)
<b>M6</b>	Eritroleucemia
<b>M7</b>	Leucemia megacarioblástica

**OBS: (FAB\*)** Grupo Cooperativo *French, American, British* para Estudo das Leucemias Agudas)<sup>(5-8)</sup>; **pmc** (pró-mielócitos); **mb** (mieloblastos); **AcMo anti MPO** (anticorpo monoclonal anti-mieloperoxidase).

**Tabela 2:**

Características imunológicas de alguns subtipos de LMA

Antígenos	Classificação FAB (*)							
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
MPO	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
CD13	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
CD33	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	-
CD34	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD11	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
CD14	-	-	-	-	+	+	-	-
CD15	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+/-	-
CD41	-	-	-	-	-	-	-	+
CD42	-	-	-	-	-	-	-	+
CD61	-	-	-	-	-	-	-	+
Glicoforina A	-	-	-	-	-	-	+	-
HLADR	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+/-	+/-

OBS: (\*) **FAB** (Grupo Cooperativo *French, American, British* para Estudo das Leucemias Agudas) <sup>(5-8)</sup>.

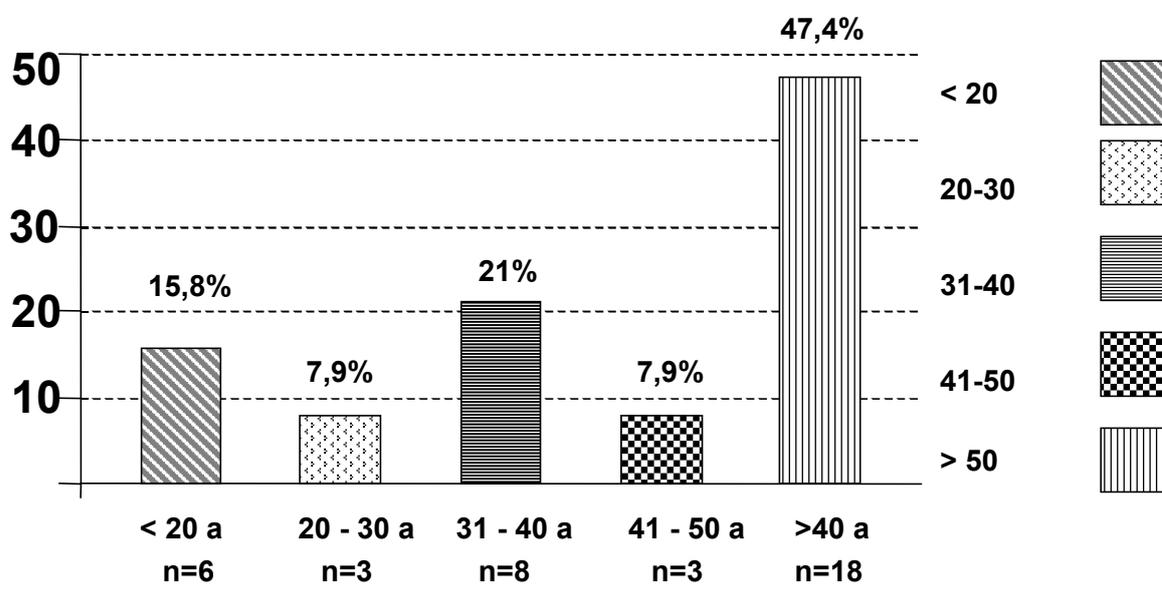
Baseado em : **RAEBEL, C.B.; CASTILLO COFIÑO, R. BRICHS L.F.; PERET, P.P.; VIVES CORRONS, J.L. & CASAS, S.W.** in *Hematologia Clínica*, cap 19, pag: 303-319, Editora Mosby / Doyma Libros, 1994 <sup>(11)</sup>.

**QUADRO 01:**

## Anticorpos Monoclonais Empregados Neste Estudo

<b>ANTICORPOS MONOCLONAIS</b>	<b>ESPECIFICIDADE</b>
CD3/CD19 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Linfócitos T e B
CD3/CD4 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Linfócitos T helper
CD3/CD8 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Linfócitos T supressor/citotóxico
CD45/CD14 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Antígeno Leucocitário Comum / Monócitos
CD34 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Células Progenitoras
CD13 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Granulócitos e Precursores
CD33 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Precursores Granulocíticos
CD10 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Antígeno Comum das Leucemias Linfóides Agudas
CD7 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Linfócitos T e Precursores
HLADR ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Antígeno de histocompatibilidade de classe II
IgM ( <i>Cecon / Policlonal</i> )	Imunoglobulina do tipo IgM
Gama 1/Gama 2 ( <i>Becton &amp; Dickinson</i> )	Controle de marcação inespecífica

**OBS:** Anticorpos Conjugados a Fluorocromos.



**Figura 01:** Distribuição do Paciente de acordo Com a Faixa Etária

**TABELA 03:**  
Aspectos Gerais da População Estudada

CASOS N°	IDADE	SEXO	FAB.	ESPLE.	HEPAT.	LINF.	HIP. GEN.
1	62 anos	M	M4	+	-	-	+
2	57 anos	M	M4	+	+	-	+
3	47 anos	F	M4	-	+	-	-
4	70 anos	M	M4	+	+	-	-
5	38 anos	M	M4	+	+	-	-
6	53 anos	M	M4	+	+	-	-
7	82 anos	M	M4	-	+	-	-
8	08 anos	M	M1	-	+	+	-
9*	17 anos	M	M3v	-	+	-	-
10	19 anos	M	M2	+	+	-	-
11	42 anos	F	M1	-	+	-	+
12	45 anos	M	M1	-	+	-	-
13	76 anos	M	M1	-	+	-	-
14	36 anos	F	M1	-	-	-	-
15	60 anos	M	M2	+	+	-	-
16	30 anos	F	M1	+	+	-	-
17	36 anos	F	M4	-	+	-	+
18	30 anos	F	M4	+	+	-	-
19	28 anos	F	M2	+	+	-	-
20	11 anos	F	M2	+	+	-	-
21	13 anos	F	M1	-	-	-	-
22	26 anos	M	M4	-	+	-	+
23	29 anos	M	M1	+	+	-	-
24	54 anos	M	M2	-	+	-	-
25*	12 anos	M	M3v	-	-	-	-
26	62 anos	M	M4	+	+	-	-
27**	67 anos	F	M1	+	+	-	-
28	73 anos	M	M1	-	-	-	-
29	73 anos	F	M1	-	+	-	-
30	68 anos	M	M5b	-	-	-	-
31	56 anos	M	M4	-	-	-	-
32***	59 anos	M	M2	-	-	-	-
33**	38 anos	F	M4	-	-	-	-
34*	36 anos	M	M3	-	-	-	-
35	66 anos	F	M6	-	-	-	-
36	36 anos	F	M4	-	-	-	-
37	68 anos	M	M4	-	-	-	-
38	42 anos	F	M6	+	-	-	-

**OBS:** **ESPLE.** (Esplenomegalia); **HEPAT.** (Hepatomegalia); **LINF.** (Linfadenopatia); **HIP. GEN.** (Hipertrofia Gengival); (\*) Fenômenos Hemorrágicos; (\*\*) Cloroma; (\*\*\*) Dor Óssea; **M** (Sexo masculino); **F** (Sexo feminino); **FAB** (Grupo Cooperativo *French, American, British* para Estudo das Leucemias Agudas) <sup>(5-8)</sup>.

**TABELA 04:**  
 Perfil Imunológico e Classificação FAB das Leucemias Estudadas

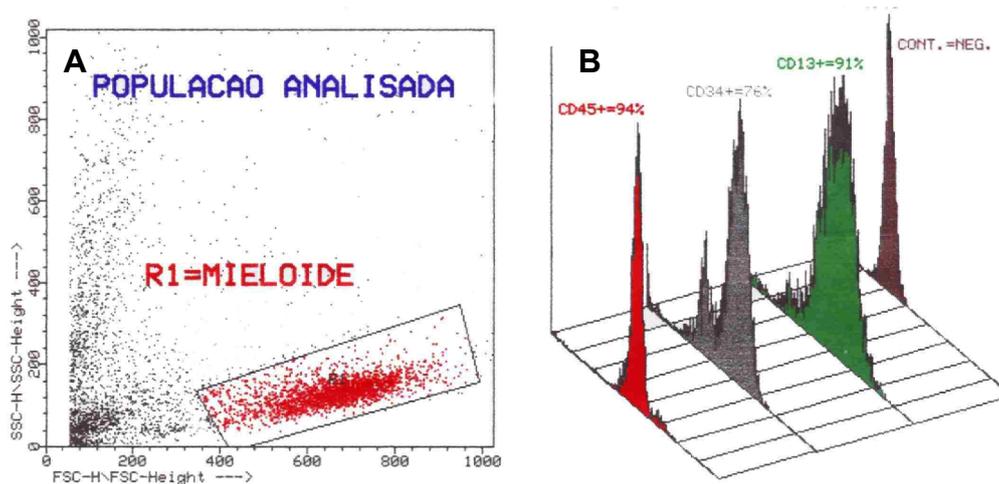
CASOS	FAB	IMUNOFENOTIPAGEM											
		CD34	CD13/CD33	CD14	CD45	CD3	CD7	CD4	CD8	CD19	IgM	CD10	HLADR
1	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
2	M4	-	+	+	+	-	-	+*	-	-	-	-	+
3	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
6	M4	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
7	M4	-	+	+	+	-	-	+*	-	-	-	-	+
8	M2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M3v	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	M1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
12	M1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
13	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
14	M1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
15	M4	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
16	M1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
17	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
19	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
20	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
21	M2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
23	M2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	M3v	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	M4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
27	M1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
28	M1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
29	M1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
30	M5b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
31	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
32	M2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
33	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
34	M3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	M6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
36	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
37	M4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
38	M6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

**Obs:** ( \* ) CD3-/CD4+; FAB (Grupo Cooperativo *French, American, British* para Estudo das Leucemias Agudas) <sup>(5-8)</sup>.

**TABELA 05:**  
Dados Laboratoriais das Leucemias Estudadas

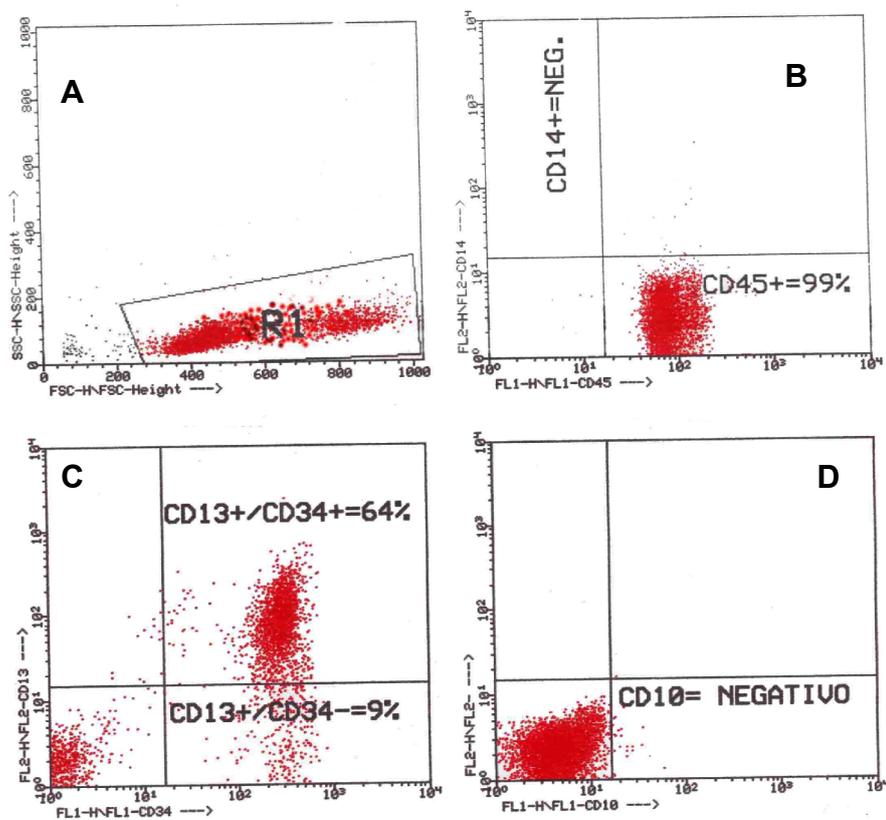
<b>CASOS Nº</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Leucometria (/ mm<sup>3</sup>)</b>	<b>FAB</b>	<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/ mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Hb (g/dl)</b>	<b>Blastos ( % ) SP</b>
1	62anos	M	53.400	M4	12,0	10,7	76
2	57anos	M	100.000	M4	12,0	7,1	80
3	47anos	F	8.100	M4	24,0	13,3	30
4	70anos	M	100.000	M4	8,8	9,8	90
5	38anos	M	19.700	M4	350,0	5,7	85
6	53anos	M	14.000	M4	263,0	9,8	36
7	82anos	M	46.000	M4	87,0	7,8	86
8	08anos	M	14.000	M1	220,0	8,0	76
9	17anos	M	100.000	M3v	100,0	8,0	90*
10	19anos	M	120.000	M2	160,0	10,8	92
11	42anos	F	8.200	M1	270,0	8,5	30
12	45anos	M	28.000	M1	450,0	11,4	90
13	76 anos	M	75.000	M4	120,0	8,9	80
14	36 anos	F	5.700	M1	20,0	9,5	54
15	60 anos	M	18.900	M4	27,0	10,0	61
16	30 anos	F	18.300	M1	44,0	8,8	65
17	36anos	F	23.000	M4	76,0	8,9	70
18	30 anos	F	61.000	M2	53,0	9,2	90
19	28 anos	F	83.800	M2	89,0	10,5	80
20	11anos	F	8.000	M2	NR	NR	80
21	13 anos	F	10.000	M1	NR	NR	60
22	26anos	M	10.000	M4	NR	NR	68
23	29 anos	M	8.100	M1	24,0	13,3	10
24	54 anos	M	120.000	M2	NR	NR	30
25	12 anos	M	45.000	M3v	20,0	7,1	80*
26	62 anos	M	35.000	M4	NR	NR	67
27	67anos	F	6.900	M1	8,0	10,0	50
28	73 anos	M	178.000	M1	91,0	8,1	62
29	73 anos	F	75.700	M1	112,0	5,8	71
30	68 anos	M	54.900	M5b	138,0	11,1	60**
31	56 anos	M	15.300	M4	58,0	9,5	90
32	59 anos	M	40.300	M2	40,0	11,6	80
33	38 anos	F	299.000	M4	161,0	12,8	78
34	36 anos	M	7.700	M3	474,0	12,2	44*
35	66 anos	F	900	M6	16,0	7,5	83***
36	36 anos	F	113.000	M4	50,0	8,5	65
37	68 anos	M	50.000	M4	NR	NR	70
38	42 anos	F	9.500	M6	13,0	7,6	63***

**OBS:** NR ( Não Realizado ), **FAB** (Grupo Cooperativo *French, American, British* para Estudo das Leucemias Agudas) <sup>(5-8)</sup>; (\*) Pro-mielócitos; (\*\*) Monoblastos e Promonócitos; (\*\*\*) Presença de precursores eritroides., **M** (Sexo masculino); **F** (Sexo feminino).



**Figura 02:** Representação gráfica de um caso de LMA pela citometria de fluxo.

**A)** Histograma representativo dos parâmetros SSC x FSC (Granulosidade X Tamanho) da população analisada (em vermelho).  
**B)** Representação gráfica de histogramas de intensidade de fluorescência de marcadores mielóides (CD13) e de células progenitoras (CD34), caracterizando um fenótipo de LMA muito imatura.



**Figura 03:** Representação Gráfica de um Caso de LMA.  
**A)** Histograma representativo dos parâmetros SSC x FSC (Granulosidade x Tamanho) da população analisada (em vermelho); **B)** Representação dos gráficos do tipo “Dot Plot” para caracterização de dupla marcação (CD45+ / CD14-); **C)** Células mielóides muito imaturas (CD34+/CD13+); **D)** Antígeno cALLA negativo (CD10-).

## DERMATOFITOSE: &IOLOGIA E PATOGENIA

### *DERMATOPHYTOSIS: &IOLOGY AND PATHOGENESIS*

*Paulo Murillo Neufeld*<sup>1,2</sup>

**Resumo:** Os dermatofitos são fungos com capacidade de digerir os tecidos queratinizados (pele, pêlos e unhas). Três gêneros principais (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*) compõem o grupo dos dermatófitos. Estados anamórficos e teleomórficos são descritos para alguns membros desses fungos. De acordo com seu habitat natural, esses organismos podem ser divididos em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. A dermatofitose é de caráter contagioso e a transmissão da enfermidade é mediada por esporos cuja formação depende da fonte de infecção. A infectividade e a patogenicidade dos dermatófitos é caracterizada pela produção de arthroconídios.

**Palavras Chaves:** Dermatófitos, patogenicidade, dermatofitose

**Summary:** The dermatophytes have the ability to invade keratinized tissue (skin, hair, and nails). Three genera (*Microsporum*, *Trichophyton*, and *Epidermophyton*) compound the dermatophytes group. Anamorphic and teleomorphic states are described to this fungous. On the basis of primary habitats association, they may be grouped as anthropophilic, zoophilic and geophilic. The dermatophytosis is a communicable disease and its transmission is mediated by spore formed according to infection source. The infectivity and the pathogenicity of dermatophytes is characterized by arthroconidia production.

**Key Words:** Dermatophytes, pathogenicity, dermatophytosis

Laboratório de Micologia  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - DACT  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ  
e-mail: pneufeld@pharma.ufrj.br

<sup>1</sup>Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

<sup>2</sup>Consultor Científico do Programa Nacional de Controle de Qualidade

Os dermatófitos são um grupo de fungos altamente especializados que, através de um longo processo evolutivo, tornaram-se capazes de invadir e colonizar os tecidos queratinizados do organismo animal (Ajello,1974).

O processo patológico desencadeado por esses microrganismos é genericamente denominado de dermatofitose (Roberts & *al.*, 1984). A infecção está normalmente restrita às estruturas cornificadas superficiais como o estrato córneo da epiderme, os pêlos e as unhas (Matsumoto e Ajello, 1987). Ocasionalmente, a derme e o tecido subcutâneo podem ser envolvidos (West e Kwong-Chung, 1980).

O termo dermatófito não corresponde a uma classificação taxonômica mas, sim a uma designação sob a qual estão agrupados fungos cujas características morfológicas, fisiológicas e antigênicas os relacionam entre si (Esteves & *al.*,1977).

De acordo com Emmons (1934), três gêneros principais (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*), diferenciados através de seus aspectos morfológicos, compõem o grupo dos dermatófitos. Em 1957, Georg e Camp redefiniram, a partir de estudos bioquímicos e nutricionais, as espécies aceitas na classificação de Emmons e, em 1987, Matsumoto e Ajello qualificaram e listaram as espécies de dermatófitos e fungos relacionados atualmente consideradas válidas (Tabela 1) .

Segundo Ajello (1962), até 1960, a taxonomia desse grupo era feita exclusivamente com base em seu estado assexuado (imperfeito ou anamórfico). Contudo, um esquema taxonômico apoiado na forma perfeita ou teleomórfica desses organismos tornou-se possível, a partir da descrição do ciclo sexuado do fungo *Trichophyton ajelloi*, por Dawson e Gentles (1959).

Tabela 1. Dermatofitos e fungos relacionados atualmente considerados válidos (Segundo Matsumoto e Ajello, 1987)

Gêneros e espécies anamórficos	
<b><i>Epidermophyton</i> Sabouraud, 1907</b>	<i>T. concentricum</i> Blanchard, 1895
<i>E. floccosum</i> (Harz) Langeron & Milochevitch, 1930	<i>T. equinum</i> (Matruchot & Dassonville) Gedoelst, 1902
<i>E. stockdaleae</i> Prochacki & Engelhard-Zasada, 1974	<i>T. flavescens</i> Padhye & Carmichael, 1971
<b><i>Microsporum</i> Gruby, 1843</b>	<i>T. georgiae</i> Varsavsky & Ajello, 1964
<i>M. amazonicum</i> Moraes, Borelli & Feo, 1967	<i>T. gloriae</i> Ajello, 1967
<i>Microsporum</i> anamorfo de <i>Arthroderma cookiellum</i> (de Clercq) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1985	<i>T. gourvilli</i> Catanei, 1933
<i>M. boullardii</i> Dominik & Majchrowitz, 1965	<i>T. longifusum</i> (Florian & Galgoczy) Ajello, 1968
<i>M. canis</i> (Bodin) Bodin, 1902 var. <i>canis</i>	<i>T. mariatii</i> Tapia de Fossaert, Mizrachi, Padhye & Ajello, 1980
<i>M. cookei</i> Ajello, 1959	<i>T. megnini</i> Blanchard, 1896
<i>M. equinum</i> (Delacroix & Bodin) Gueguen, 1904	<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanchard, 1896
<i>M. ferrugineum</i> Ota, 1921	<i>T. phaseoliforme</i> Borelli & Feo, 1966
<i>M. fulvum</i> Uriburu, 1909	<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud, 1911
<i>M. gallinae</i> (Megnin) Grigorakis, 1928	<i>T. schoenleinii</i> (Lebert) Langeron & Milochevitch, 1930
<i>M. nanun</i> Fuentes, 1956	<i>T. simii</i> (Pinoy) Stockdale, Mackenzie & Austwick, 1965
<i>M. persicolor</i> (Sabouraud) Guiart & Grigorakis, 1928	<i>T. soudanense</i> Joyeux, 1912
<i>M. praecox</i> Rivalier, 1954	<i>T. terrestre</i> Durie & Frey, 1957
<i>M. racemosum</i> Borelli, 1965	<i>T. vanbreuseghemii</i> Rious, Tarry & Tuminer, 1964
<i>M. ripariae</i> Hubalek & Rush-Munro, 1973	<i>T. tonsurans</i> Malmsten, 1845
<i>M. vanbreuseghemii</i> Georg, Ajello, Fridman & Brinkman, 1962	<i>T. verrucosum</i> Bodin, 1902
<b><i>Trichophyton</i> Malmsten, 1845</b>	<i>T. violaceum</i> Bodin, 1902
<i>T. ajelloi</i> (Vanbreuseghemii) Ajello, 1968	

Originalmente, a maioria dos dermatofitos foi descrita como *Hyphomycetes* (Matsumoto e Ajello, 1987). Porém, com a descoberta de seu estado sexuado (perfeito ou

teleomórfico), esses fungos passaram a ser classificados na família *Arthrodermataceae* (ordem *Onygnales*, subdivisão *Ascomycotina*), que acomoda os gêneros *Arthroderma* e *Nannizzia* cujos correspondentes assexuados ou anamórficos são, respectivamente, os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* (Currah, 1985; Leclerc & al., 1994). A Tabela 2 relaciona os estados teleomórficos e anamórficos dos dermatófitos.

Takashio (1979) e McGinnis & al. (1980), através de estudos morfológicos e moleculares, têm demonstrado a artificialidade da distinção entre *Arthroderma* e *Nannizzia*. A idéia de que esses dois teleomorfos formam um único gênero é sustentada por Weitzman & al. (1986) e Kawasaki & al. (1992) que propõem a união de ambos os *taxa* em torno do gênero *Arthroderma*. Apesar do relacionamento filogenético do *Epidermophyton* ser ainda desconhecido, devido a não descrição de seu estado perfeito, Kawasaki & al. (1992) afirmam que estudos futuros poderão demonstrar a proximidade desse fungo com o gênero *Arthroderma*.

Segundo Matsumoto e Ajello (1987), todos os teleomorfos conhecidos das espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* são heterotálicos, ou seja, apresentam características de sexualidade masculina e feminina separadas nos indivíduos. A exceção fica por conta do *Trichophyton geogiae* cujo o teleomorfo (*Arthroderma cifferii*) é homotálico, isto é, “hermafrodita”. Assim, para que ocorra cruzamento, há necessidade de dois tipos conjugantes complementares (“mating types”), convencionalmente designados como “+” e “-” ou “A” e “a” (Takashio, 1979).

A distribuição geográfica dos dermatófitos não ocorre de maneira uniforme (Ajello, 1974; Blank & al., 1974). De modo geral, esses fungos são cosmopolitas (Georg, 1960; Otcenasek, 1978). Entretanto, determinadas espécies são regionalmente limitadas ou endêmicas (Philpot, 1977, 1978).

Tabela 2. Teleomorfos e anamorfos dos dermatófitos e fungos relacionados (Segundo Matsumoto e Ajello, 1987)

Teleomorfos	Anamorfos
<i>Arthroderma</i> Currey ex Berkeley emend. Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>Microporum</i> Guby, 1843 <i>Trichophyton</i> Malmsten, 1845
<i>A. benhamiae</i> Ajello & Cheng, 1967	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>A. borellii</i> (Moraes, Padhye & Ajello) Padhye, Weitzman, McGinnis & Ajello, 1986	<i>M. amazonicum</i>
<i>A. cajani</i> (Ajello) Ajello, Weitzman, McGinnis & Padhye, 1986	<i>M. cookei</i>
<i>A. ciferrii</i> Varsavsky & Ajello, 1964	<i>T. georgiae</i>
<i>A. cookiellum</i> (de Clercq) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>Microsporium</i> anamorfo de <i>A. cookiellum</i>
<i>A. corniculatum</i> (Takashio & de Vroey) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. boullardii</i>
<i>A. flavescens</i> Padhye & Carmaechel, 1971	<i>T. flavescens</i>
<i>A. fulvum</i> (Stockdale) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. fulvum</i>
<i>A. gertleri</i> Bohme, 1967	<i>T. vanbreuseghemii</i>
<i>A. gloriae</i> Ajello, 1967	<i>T. gloriae</i>
<i>A. grubyi</i> (Georg, Ajello, Fridman & Brinkman) Ajello, Weitzman, McGinnis & Padhye, 1986	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>A. gypseum</i> (Nannizzi) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. gypseum</i>
<i>A. incurvatum</i> (Stockdale) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. gypseum</i>
<i>A. insingulare</i> Padhye & Carmichael, 1972	<i>T. terrestre</i>
<i>A. lenticularum</i> Pore, Tsao & Plunkett, 1965	<i>T. terrestre</i>
<i>A. obtusum</i> (Dawson & Gentles) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. nanum</i>

Tabela 2. Continuação

Teleomorfos	Anamorfos
<i>A. otae</i> (Hasegawa & Usui) McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. canis</i> var. <i>canis</i> <i>M. canis</i> var. <i>distortum</i>
<i>A. persicolor</i> (Stockdale) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. persicolor</i>
<i>A. quadrifidum</i> Dawson & Gentles, 1961	<i>T. terrestre</i>
<i>A. simii</i> Stockdale, Mackenzie & Austwick, 1965	<i>T. simii</i>
<i>A. racemosum</i> (Rush-Munro, Smith & Borelli) Weitzman, McGinnis, Padhye & Ajello, 1986	<i>M. racemosum</i>
<i>A. unicum</i> Dawson & Gentles, 1961	<i>T. ajelloi</i>
<i>A. vanbreuseghemii</i> Takashio, 1973	<i>T. mentagrophytes</i>

De acordo com o habitat natural (Tabela 3), esses organismos podem ser divididos em antropofílicos, quando adaptados à queratina dos seres humanos; zoofílicos, quando adaptados à queratina dos animais; e geofílicos, quando se desenvolvem às expensas da queratina encontrada no solo (Dvorak e Otcenasek, 1964; González-Cabo e Bárcena-Asensio, 1996). Membros dos grupos antropofílico e zoofílico podem, sob certas condições, infectar outros hospedeiros além daqueles para os quais estão adaptados (Kaplan & al., 1958; Georg, 1960). Porém, estes têm dificuldades em sobreviver e proliferar como sapróbios de solo (Grin e Ozeovic, 1963). Alguns indivíduos do grupo geofílico não são capazes de invadir os tecidos queratinizados do homem e dos animais. As espécies geofílicas que não tem habilidade de parasitar os organismos vivos não são patogênicas e, portanto, conceitualmente não são consideradas dermatófitos. Essas espécies devem ser simplesmente reconhecidas como membros geofílicos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (Matsumoto e Ajello, 1987). Os fatores que controlam a diferenciação dos

dermatófitos em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos não estão ainda bem estabelecidos (Ajello, 1974).

Tabela 3. Epidemiologia e Ecologia dos Dermatófitos e fungos relacionados (Segundo Matsumoto e Ajello, 1987)

Dermatófitos			
Antropofílicos	Zoofílicos	Geofílicos	Geofílicos não patogênicos
Cosmopolitas			
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i> var. <i>canis</i>	<i>M. cookei</i>	<i>Microsporum</i> anamorfo de <i>A. cookiellum</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. ajello</i>
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitales</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. fulvum</i>	<i>T. terrestre</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. nanum</i>	
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>		
<i>T. violaceum</i>	<i>T. verrucosum</i>		
Limitados			
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. canis</i> var. <i>distortum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>E. stockdaleae</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	<i>M. praecox</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>T. gourvilli</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i>	<i>M. racemosum</i>	<i>M. boullardii</i>
<i>T. megninii</i>		<i>M. vanbreuseghmii</i>	<i>M. magellanicum</i>
<i>T. schoenleinii</i>		<i>T. phaseoliforme</i>	<i>M. ripariae</i>
<i>T. soudanense</i>		<i>T. simii</i>	<i>T. falvenscens</i>
<i>T. yaoundei</i>		<i>T. vanbreuseghemii</i>	<i>T. georgiae</i>
			<i>T. gloriae</i>
			<i>T. longifusum</i>

As formas perfeitas de quase todos os dermatófitos são descritas, todavia, a maioria dos teleomorfos das espécies antropofílicas e zoofílicas são ainda desconhecidas (Matsumoto e Ajello, 1987). As espécies antropofílicas têm demonstrado uma tendência a perder a capacidade de ser reproduzir sexuadamente (Tanaka & *al*, 1992). Provalvemente, este fato tem condicionado a inexistência de fase sexuada entre esses fungos (Takashio, 1979).

O habitat dos dermatófitos tem papel significativo na epidemiologia das infecções humana e animal (Georg, 1960). A distinção das espécies em antropofílicas, zoofílicas e geofílicas é importante para determinação da fonte de infecção (Ajello, 1960). Com poucas exceções, a exposição ao solo contaminado e o contato direto ou indireto com indivíduos infectados são os modos de transmissão das dermatofitoses (Kaplan & *al*, 1958; Ajello, 1962). Dessa maneira, fômites que contenham resíduos infectados de pele, pêlos e unhas funcionam como importantes fontes de infecção (Lopez-Martinez, 1986).

A transmissão da enfermidade é mediada por esporos ou propágulos cuja formação depende da fonte de infecção (Emyanitoff e Hashimoto, 1979). Assim sendo, a partir de fontes sapróbias, tais como o solo, a doença é transmitida aos indivíduos através dos macro e microconídios e, a partir de fontes humana e animal, através dos artroconídios (Wright & *al.*, 1984; Fujita e Matsuyama, 1987).

É importante reconhecer que nenhum conídio sapróbio é formado sob condições de parasitismo. Macro e microconídios podem ser produzidos em pêlos despreendidos, mas, não em pêlos vivos. Aparentemente, o mecanismo que controla a conidiogênese sapróbia é suprimido quando o dermatófito infecta os tecidos. O fungo parece ativar um sistema alternativo de produção de conídios que lhe permite sobreviver e se reproduzir sob as condições adversas do parasitismo. Neste estado, somente artroconídios são formados. Por

sua vez, quando o microrganismo se encontra em vida livre, arthroconídios dificilmente são produzidos (Barrera, 1983, 1986; Hashimoto & *al.*1984).

Apesar dos macro e microconídios estarem relacionados à sobrevivência e propagação dos dermatófitos na natureza, os elementos patogênicos mais importantes na transmissão da infecção são os arthroconídios, frequentemente associados a situações de expoliação (Fujita e Matsuyama, 1987).

Dos muitos fungos produtores de micose, somente os dermatófitos mostram uma evolução no sentido de uma existência parasítica. As espécies antropofílicas e zoofílicas provavelmente evoluíram a partir de amostras geofílicas que se associaram aos tecidos queratinizados dos organismos vivos (Dvorak e Otcenasek, 1964). Segundo Rippon (1982), a história filogenética desses fungos, respeitadas as diversas fontes, inclui: evolução de fungos especializados do solo com habilidade queratinolítica; associação com fâneros animais e capacidade de produzir infecções transitórias; adaptação ao crescimento em zonas queratinizadas vivas; acomodação e equilíbrio ao hospedeiro; desenvolvimento de métodos especializados de reprodução e disseminação de um hospedeiro para o outro; e adaptação a um hospedeiro animal específico, aumentando a capacidade de sobrevivência e disseminação e a cronicidade da infecção.

O estrato córneo é estéril ao nascimento, todavia, logo é colonizado pelos microrganismos de sua microbiota natural. Os dermatófitos não fazem parte da microbiota, mas, podem invadir e colonizar a pele (Clayton e Midgley, 1989; Tsuboi & *al.*, 1994). Os tecidos queratinizados podem funcionar como um ambiente favorável ao desenvolvimento desses fungos. De acordo com Tsuboi & *al.* (1994), diversos fatores estão envolvidos nesse processo: as células do estrato córneo estão mortas e distantes dos mecanismos de defesa; o estrato córneo é bem hidratado pelas glândulas sudoríparas e pela perda transepidermal de

água; a temperatura da pele é mais baixa do que a temperatura corporal; o pH da pele está em torno de 5.5 a 6.7; a pele é um órgão diretamente exposto ao ar atmosférico; e certos sítios anatômicos como o couro cabeludo, o espaço interdigital, a região crural e a porção distal das unhas aumentam a colonização e o crescimento dos dermatófitos. Contudo, são fatores impeditivos à sobrevivência desses fungos sobre o organismo: a presença das células de Langerhans; a fagocitose dos queratinócitos; as propriedades inibitórias do suor e dos lipídios e dióxido de carbono da superfície da pele; e a característica proliferativa da epiderme.

Considerável progresso tem sido feito no estudo dos fatores que contribuem para a patogenicidade dos fungos (Ogawa & *al.*, 1992). A patogenicidade é genericamente definida como a capacidade de um microrganismo em causar doença, que poderá ou não ocorrer, dependendo do resultado da interação entre o agente biológico e o hospedeiro (Smith, 1977; Ghannoum e Abu-Elteen, 1990). Dentre os vários fatores envolvidos na patogenicidade e virulência microbiana, a aderência aos tecidos vivos; a variabilidade fenotípica; e a produção de toxinas e enzimas estão entre os mais frequentemente listados (Kwong-Chung & *al.*, 1992; Garbajosa-Jones, 1994).

A infectividade e a patogenicidade dos dermatófitos é caracterizada pela produção de arthroconídios (Rashid & *al.*, 1993). A aderência aos queratinócitos da pele e a germinação arthroconidial parecem ser cruciais para o estabelecimento da infecção. Quando ocorrem falhas no processo de aderência, a germinação não é observada e o propágulo infectante é liberado junto com o material de descamação normal da epiderme. A germinação dos arthroconídios deve ser considerada como um fator de importância patogênica na dermatofitose (Tsuboi & *al.*, 1994).

Aljabre & al. (1992) afirmam que os artroconídios requerem alta umidade e substâncias indutoras para a germinação. A camada superficial da pele contém uma variedade de agentes químicos derivados do suor, das glândulas sebáceas e do próprio processo de queratinização. Existem ainda muitos metabólitos produzidos por bactérias a partir de lipídios e proteínas cutâneas que também são estimulantes da germinação.

Para o desenvolvimento de uma infecção ativa na pele intacta, o conídio germinante deve penetrar na camada de queratina, estabelecendo o sítio de parasitismo. Usualmente, a hifa emergente é capaz de uma penetração tanto mecânica quanto enzimática. (Hay & al., 1988). Alguns dermatófitos produzem estruturas especializadas para favorecer a invasão (English, 1968; Kanbe e Tanaka, 1982). Várias enzimas extracelulares como proteases, lipases, fosfatases, nucleases e glicosidases são também produzidas com esse fim (Calvo & al., 1986).

As enzimas proteolíticas, notadamente queratinases, collagenases e elastases, são as mais comumente implicadas na patogenia das dermatofitoses (Apodaca e McKerrow, 1989; Tsuboi & al., 1989). Algumas dessas enzimas estão envolvidas na facilitação da penetração do tubo germinativo ou da hifa nos tecidos queratinizados; na tomada de nutrientes para o crescimento fúngico; e na produção de uma resposta imune local (Calvo & al., 1985; Skorepova e Hauck, 1987). A habilidade dos dermatófitos em elaborar essas enzimas hidrolíticas *in vivo* é também um importante fator de virulência (Isenberg, 1988).

Tsuboi & al. (1994) propõem os seguintes eventos na invasão e na colonização do estrato córneo: aderência dos artroconídios aos queratinócitos; germinação do artroconídios; penetração do tubo germinativo no estrato córneo; e finalmente formação de novos artroconídios. Na penetração do estrato córneo, o tubo germinativo cresce transversal e longitudinalmente, se ramificando em todos os sentidos. De acordo com Aljabre (1993),

seis horas após a adesão, inicia-se a germinação, e s&e dias depois de começado o processo, há produção dos artroconídios, compl&ando o ciclo parasitário. A erosão superficial e a pen&ração radial representam a expressão morfológica da queratinólise (Filipello-Marchisio & *al.*, 1994).

Segundo Kunert (1992), a compl&a hidrólise da queratina somente é conseguida após a clivagem das ligações dissulf&o que representam a principal fonte de resistência dessa escleroproteína. As queratinases são incapazes de dissolver a queratina por si só, para tanto, há necessidade de haver uma sulfólise prévia das pontes de enxofre que desnaturam a queratina e estimulam a atividade queratinolítica do fungo (Kunert, 1972).

A hidrólise da queratina por enzimas proteolíticas é um aspecto conspícuo na patogênia das dermatofitoses. Entr&anto, de acordo com os estudos de Tanaka & *al* (1992), algumas proteinases extracelulares purificadas de espécies de *Trichophyton* e *Microsporium* são ativas apenas em pH neutro ou alcalino. Tendo a pele um pH fracamente ácido em sua superfície, há dúvidas se as queratinases trabalham como fatores de virulência.

As variações individuais e locais dos ambientes cutâneos podem modular a patogenicidade dos elementos fúngicos depositados sobre a epiderme (Baudraz-Rossel& e Frenk, 1990). A produção de enzimas extracelulares é dependente dos substratos acessíveis *in vivo* para o crescimento do dermatófito (Brasch, Martins e Christophers, 1991), conseqüentemente, a agressividade do fungo sobre as estruturas queratinizadas poderá ser maior ou menor, conforme o suprimento nutricional encontrado (Baudraz-Rossel& e Frenk, 1990; Brasch, Martins e Christophers, 1991).

A formação de enzimas e a habilidade de causar inflamação cutânea contribuem para espalhamento do fungo (Brasch e Zaldura, 1994). Como o dermatófito, em geral, não é

capaz de sobreviver a uma reação inflamatória, tende constantemente a se afastar da região inflamada, fixando-se no tecido normal adjacente (Jungerman e Schwartzerman, 1977).

Os dermatófitos não invadem as estruturas subepidermais, porém, produzem respostas inflamatórias definidas e reações imunes mediadas por células em todos os indivíduos normais (Tanaka & *al.*, 1992). A doença é desencadeada a partir da elaboração e secreção de substâncias tóxicas ou alergênicas que se difundem pela epiderme, atingido a derme vascularizada que é potencialmente capaz de responder a agressão dos materiais irritantes, por meio de uma resposta inflamatória (Jungerman e Schwartzerman, 1977). A resposta a infecção é extremamente variável e irá depender da interação de diversos fatores envolvidos (Tanaka & *al.*, 1992). Os processos inflamatórios e imunológicos produzidos nas áreas vivas próximas ao sítio infeccioso são incidentais e refletem a perda ou o baixo grau de adaptação entre o hospedeiro e o fungo (Rippon, 1982).

Diferentes tipos de defesa orgânica estão implicados nas dermatofitoses. Durante a doença aguda, infiltrados neutrofilicos se desenvolvem na epiderme. Nos processos crônicos, infiltrados dérmicos de células mononucleares e algumas células linfóides epidérmicas são comuns e estão relacionados à resposta imune celular (Tanaka & *al.*, 1992). Apesar de controverso, anticorpos circulantes e outros elementos humorais têm sido detectados no soro de animais e homens infectados (Grappel & *al.*, 1974; Calderon, Hay e Shennan, 1987).

Em resumo, a história natural das dermatofitoses é inicialmente a mesma, não importando a espécie envolvida. A colonização começa na camada queratinizada da pele e o resultado final da infecção irá depender do hospedeiro, da espécie fúngica e do sítio infeccioso (Blank e Mann, 1975). Entretanto, a severidade da doença está basicamente

relacionada à capacidade enzimática dos dermatófitos (Kashkin e Voevodin, 1976; Das e Banerjee, 1977).

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. **AJELLO, L.** Geographic distribution and prevalence of the dermatophytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 89, p. 30-38, 1960.
2. \_\_\_\_\_. Present day concepts of the dermatophytes. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 17, n. 4, p. 315-322, 1962.
3. \_\_\_\_\_. Natural history of dermatophytes and related fungi. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 53, p. 93-110, 1974.
4. **ALJABRE, S. H. M.; RICHARDSON, M. D.; SCOTT, E. M. & SHANKLAND, G. S.** Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 30, p. 145-152, 1992.
5. \_\_\_\_; \_\_\_\_; \_\_\_\_; **RASHID, A. & \_\_\_\_\_**. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 18, p. 231-235, 1993.
6. **APODACA, G. & MCKERROW, J. H.** Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 3081-3090, 1989.
7. **BARRERA, C. R.** Formation and ultrastructure of *Mucor rouxii* arthrospores. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 55, p. 886-895, 1983.

8. \_\_\_\_\_. Formation and germination of fungal arthroconidia. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, v. 12, p. 271-292, 1986.
9. **BAUDRAZ-ROSSEL, F. & FRENK, E.** "In vitro" nail invasion by pathogenic and non-pathogenic fungi under different culture conditions. *Mycoses*, Berlin, v. 33, p. 553-557, 1990.
10. **BLANK, F.; MANN, J. & PEALE, P. A.** Distribution of dermatophytosis according to age, ethnic group or sex. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v. 12, p. 352-361, 1974.
11. \_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. *Trichophyton rubrum* infections according to age, anatomical distributions and sex. *British Journal of Dermatology*, v. 92, p. 171-174, 1975.
12. **BRASCH, J.; MARTINS, B. S. & CHRISTOPHERS, E.** Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses*, Berlin, v. 34, p. 365-368, 1991.
13. \_\_\_\_ & **ZALDUA, M.** Enzyme patterns of dermatophytes. *Mycoses*, Berlin, v. 37, p. 11-16, 1994.
14. **CALDERON, R. A.; HAY, R. J. & SHENNAN, G. I.** Circulating antigens and antibodies in human and mouse dermatophytosis: use of monoclonal antibody reactive to phosphorylcholine like epitopes. *Journal of General Microbiology*, v. 133, p. 2699-2705, 1987.
15. **CALVO, M. A.; BRUGUERA, T.; CABANES, F. J.; TRAPE, J. & ABARCA, L.** Brief Communication: Extracellular enzymatic activities of dermatophytes. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 92, p. 19-22, 1985.

16. \_\_\_\_; **TRAPE, J.; ABARCA, L.; CABANES, F. J.; CALVO, R. M. & BRUGUERA, T.** Variability of biochemical characteristics in strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 93, p. 137-139, 1986.
17. **CLAYTON, Y. M. & MIDGLEY, G.** Identification of agents of superficial mycoses. In EVANS, E. G. V., RICHARDSON, M. D. eds. *Medical Mycology: A Practical Approach*. Oxford, IRL Press, pp. 65-95, 1989.
18. **CURRAH, R. S.** Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon*, Ithaca, v. 24, p. 1-126, 1985.
19. **DAS, S. K. & BANERJEE, A. B.** Phospholipid turnover in *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v. 15, p. 99-102, 1977.
20. **DAWSON, C. O. & GENTLES, J. C.** Perfect state of *Keratinomyces ajelloi*. *Nature*, v. 183, p. 1345-1346, 1959.
21. **DVORAK, J. & OTCENASEK, M.** Geophilic, zoophilic and anthropophilic dermatophytes. A review. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 23, p. 294-296, 1964.
22. **EMMONS, C. W.** Dermatophytes natural grouping based on the form of the spore and accessory. *Archives of Dermatology and Syphilology*, Chicago, v. 30, n. 3, p. 337-362, Sep. 1934.
23. **EMYANITOFF, R. G. & HASHIMOTO, T.** The effects of temperature and incubation atmosphere and medium composition on arthrospore formation in the fungus *Trichophyton mentagrophytes*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 25, p. 362-366, 1979.

24. **ENGLISH, M. P.** The developmental morphology of the perforating mycelium of dermatophytes. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v. 6, p. 218-229, 1968.
25. **ESTEVES, J. A.; CABRITA, J. D. & NOBRE, G. N.** *Micologia Médica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. *Micoses Superficiais: Dermatofitias*: p. 282-374.
26. **FILIPELLO-MARCHISIO, V.; FUSCONI, A. & RIGO, S.** Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia*, v. 127, p. 103-115, 1994.
27. **FUJITA, S. & MATSUYAMA, T.** Experimental *tinea pedis* induced by non-abrasive inoculation of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores on the plantar part of a guinea pig foot. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, Oxfordshire, v. 25, p. 203-213, 1987.
28. **GAR&H-JONES, E. B.** Fungal adhesion. *Mycological Research*, Cambridge, v. 98, n. 9, p. 961-981, 1994.
29. **GARRAWAY, M. O. & EVANS, R. C.** *Fungal Nutrition and Physiology*. New York: John Wiley & Sons, 1984. *Respiration*: p. 298-305.
30. **GENTLES, J. C. & SCOTT, E.** The preservation of medically important fungi. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v. 17, p. 415-418, 1979.
31. **GEORG, L. K.** Epidemiology of the dermatomycoses, sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 89, p. 69- 77, 1960.
32. \_\_\_\_ & **CAMP, L. B.** Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. *Journal of Dermatology*, Tokyo, v. 74, p. 113-121, 1957.

33. **GHANNOUM, M. A. & ABU-ELTEEN, K. H.** Pathogenicity d&erminants of *Candida*. *Mycoses*, Berlin, v. 33, n. 6, p. 265-282, 1990.
34. **GONZÁLES-CABO, J. F. & BÁRCENA-ASENSIO, M. C.** Ecología de los dermatofitos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 13, p. 47-54, 1996.
35. **GRAPPEL, S. F.; BISHOP, C. T. & BLANK, F.** Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriological Reviews*, v. 38, p. 222-250, 1974.
36. **GRIN, E. & OZEGOVIC, L.** Influence of the soil on certain dermatophytes and their evolutionary trend. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 21, p. 23-28, 1963.
37. **HASEGAWA, A. & URSUI, K.** *Nannizzia otae* sp. nov. the perfect state of *Microsporum canis*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, Tokyo, v. 16, p. 148-153, 1975.
38. **HASHIMOTO, T.; EMYANITOFF, R. G.; MOCH, R. C. & POLLACK, J. H.** Morphogenesis of arthroconidiation in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* with special reference to wall ontogeny. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 30, p. 1415-1421, 1984.
39. **HAY, R. J.; CALDERON, R. A. & MACKENZIE, C. D.** Experimental dermatophytosis in mice: Correlation b&ween light and el&ron microscopic changes in primary and secondary and chronic infections. *British Journal of Experimental Pathology*, Oxford, v. 69, p. 703-715, 1988.
40. **ISENBERG, H. D.** Pathogenicity and virulence: Another view. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 1, n.1. p. 40-53, 1988.

41. **JUNGERMAN, P. F. & SCHWARTZMAN, R. M.** *Micologia Medica Veterinaria*. 1<sup>a</sup> ed. Mexico: Continental, 1977. Microsporiasis y trichofitosis: Dermatomicosis (tiña): p. 13-44.
42. **KANBE, T. & TANAKA, K.** Ultrastructure of the invasion of human hair "in vitro" by the keratinophilic fungus *Microsporum gypseum*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 38, p. 706-715, 1982.
43. **KAPLAN, W.; GEORG, L. K. & AJELLO, L.** Recent development in animal ringworm and their public health implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 70, p. 636-649, 1958.
44. **KASHKIN, A. P. & VOEVODIN, Y. N.** Proteolytic enzymes of *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard. *Mikologija i Fitopatologija*, Leningrad, v. 10, p. 179-185, 1976.
45. **KAWASAKI, M.; AOKI, M.; ISHIZAKI, H.; NISHIO, K.; MOCHIZUKI, T. & WATANABE, S.** Phylogenetic relationship of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* as inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 118, p. 95-192, 1992.
46. **KWONG-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; ELLIS, D. & HOWARD, D. H.** Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *Gatti*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 60, n. 5, p. 1869-1874, 1992.
47. **KUNERT, J.** Keratin decomposition by dermatophytes. Evidence of the sulphitolysis of protein. *Experientia*, v. 28, p. 1025, 1972.
48. \_\_\_\_\_. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*, v. 35, p. 343-348, 1992.

49. **LECLERC, M. C.; PHILLIPE, H. & GUEHO, E.** Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire*, v. 32, p. 331-341, 1994.
50. **LÓPEZ-MARTINEZ, R.** Investigación de algunas fuentes de infección en las dermatofitosis. *Estudios de suelos, animales y hombre. Gaceta Médica de México*, v. 122, p. 167-172, 1986.
51. **MATSUMOTO, T. & AJELLO, L.** Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. *International Journal of Dermatology, Philadelphia*, v. 26, n. 8, p. 491-499, Oct. 1987.
52. **MCGINNIS, M. R.** Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. *Annual Review of Microbiology, Palo Alto*, v. 34, p. 109-135, 1980.
53. **OGAWA, H.; NOZAWA, Y.; ROJANAVANICH, V.; TSUBOI, R.; YOSHIIKE, T.; BANNO, Y.; TAKAHASHI, M.; NOMBELA, C.; HERREROS, E.; GARCIA-SAENZ, M. I.; SANTOS, A. I. & SANCHEZ, M.** Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infection. *Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire*, v. 30, p. S189-S196, 1992. Supplement, 1.
54. **OTCENASEK, M.** Ecology of the dermatophytes. *Mycopathologia, Den Haag*, v. 65, p. 67-72, 1978.
55. **PHILPOT, C. M.** Some aspects of the epidemiology of *tinea*. *Mycopathologia, Den Haag*, v. 62, p. 3-13, 1977.
56. \_\_\_\_\_. Geographical distribution of dermatophytes: A review. *Journal of Hygiene, Cambridge*, v. 80, p. 301-313, 1978.

57. **RASHID, A.; SCOTT, E. M. & RICHARDSON.** Effects of terbinafina exposure on the ultrastructure of *Trichophyton interdigitales*. Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire, v. 31, p 305-313,1993.
58. **RIPPON, J. W.** Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and Actinomycetes. Philadelphia: Saunders, 1982. Dermatophytosis and dermatomycosis: p. 154-248.
59. **ROBERTS, S. O. B.; HAY, R. J. & MACKENZIE, D. W. R.** A Clinician's Guide to Fungal Disease. New York: Dekker, 1984. Ringworm (*tinea*, dermatophytes infection, dermatophytosis): p. 56-102.
60. **SKOREPOVA, M. & HAUCK, H.** Extracellular proteinases of *Trichophyton rubrum* and the clinical picture of *tinea*. Mycosen, v. 30, p. 25-27, 1987.
61. **SMITH, H.** Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriological Reviews, Baltimore, v. 41, n. 2, p. 475-500, 1977.
62. **TAKASHIO, M.** Taxonomy of dermatophytes based on their sexual states. Mycologia, New York, v. 7, p. 968-976, 1979.
63. **TANAKA, S.; SUMMERBELL, R. C.; TSUBOI, R.; KAAMAN, T.; SOHNLE, P. G.; MATSUMOTO, T. & RAY, T.L.** Advances in dermatophytes and dermatophytosis. Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire, v 30, p. S29-S39, 1992. Supplement, 1.
64. **TSUBOI, R.; OGAWA, H.; BRAMONO, K.; RICHARDSON, M. D.; SHANKLAND, G. S.; CROZIER, W. J.; SEI, Y.; NINOMIYA, J.; NAKABAYASHI, A.; TAKAIUCHI, I.; PAYNE, C. D. & RAY, T. L.** Pathogenesis of superficial mycoses. Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire, v. 32, p. S91-S104, 1994. Supplement, 1.

65. **WEIGL, E. & HEJTMANKOVA, M.** Differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores controlled by physical factors. *Mykosen*, Berlin, v. 22, p. 167-172, 1979.
66. \_\_\_\_ & \_\_\_\_ . Arthrosporogenesis in *Trichophyton mentagrophytes* on agar medium and in guinea pig skin. *Mykosen*, Berlin, v. 23, p. 486-493, 1980.
67. **WEITZMAN, I.; MCGINNIS, M. R.; PADHYE, A. A. & AJELLO, L.** The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. *Mycotaxon*, Ithaca, v. 25, p. 505-518, 1986
68. **WEST, B. C. & KWONG-CHUNG, K. J.** Myc&oma caused by *Microsporum audouinii*. *American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, v. 73, p. 447-454, 1980.
69. **WRIGHT, L. R.; SCOTT, E. M. & GORMAN, S. P.** Spore differentiation in a clinical strain of *Trichophyton mentagrophytes*. *Microbios*, Cambridge, v. 39, p. 87-93, 1984.

## **EFEITOS DE CHITOSAN E NARINGENINA SOBRE LIPÍDEOS NO SORO DE COELHOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON.**

Effects of chitosan and naringenin on lipids serum in hyperlipidemic rabbits induced by Triton

*Lopes<sup>1</sup>, R. M. ; Oliveira<sup>1</sup>, T. T.; Nagem<sup>2</sup>, T. J.; ; Pinto<sup>3</sup>, A. S.; Camini<sup>1</sup>, N. A. Leão<sup>1</sup>, M. A.*

**RESUMO:** Chitosan, uma substância natural derivada da quitina, juntamente com naringenina, uma flavanona, foram testadas em coelhos hiperlipidemicos induzidos por Triton WR 1339. Para tanto elas foram administradas, via intraperitoneal, na dose de 30mg/Kg de peso corporal, vinte horas após a administração do Triton. Decorridos vinte e quatro horas da administração das drogas, foram coletadas amostras de sangue, centrifugadas e dosados colesterol, HDL-colesterol e triacilgliceróis. Os resultados mostraram que chitosan associado à naringenina mostrou maior percentagem de redução para colesterol e triacilgliceróis enquanto que para HDL-colesterol chitosan foi mais efetivo.

**SUMMARY:** Chitosan, a derived natural compound from quitin together with naringenin, a flavanone, were tested in hyperlipidemic rabbits induced by Triton WR 1339. They were administered by intraperitoneal route in the dosis of 30mg/Kg of corporal weight, twenty hours after the administration of Triton. Elapsed twenty-four hours after drug's administration, the blood were analyzed. Results evidence that chitosan + naringenin present the largest percentual of reduction of cholesterol and triacilglicerols while the best results for cholesterol-HDL have been obtained with chitosan.

1- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2- Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

3-Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## INTRODUÇÃO

Triton WR 1339 conhecido como tyloxapol, um detergente não anionico de estrutura polimérica da SIGMA, tem sido utilizado por diversos pesquisadores para induzir hiperlipidemia em animais experimentais (Mathur et al., 1964; Siddiqui et al., 1996; Sharma, 1979; Choi et al., 1991).

Dados recentes mostram que mistura de flavonóides kaempferitrina, isoladamente, mostraram ação hipotensiva em sistema cardiovascular de coelhos e ratos com hipertensão induzida. A kaempferitrina na dose de 290  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  diminuiu a pressão sangüínea em 32% e a freqüência cardíaca em 29% em coelhos, já a mistura de flavonóides diminuiu a pressão em 41% e a freqüência cardíaca em 33% na dose de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . A alta atividade da mistura de flavonóides pode ser atribuída à seu efeito sinérgico (Gohar et al., 1997).

Agullo et al., 1997, relatam a ação de flavonóides nas etapas iniciais da ação insulínica no fígado e músculo de ratas *in vivo*. A insulina tem um papel central na regulação da glicemia e atua de maneira coordenada no metabolismo lipídico e protéico. Atua a nível celular através de seu receptor transmembrana que tem uma atividade de tirosina quinase. Levando-se em conta que a dieta fornecida à coelhos tem em torno de 80% de carboidratos, esta ação torna-se muito importante.

Em coelhos, a fermentação de carboidratos no ceco produz ácidos voláteis, tais como ácido acético, ácido propiônico, que são fontes de energia para o metabolismo dos constituintes do intestino grosso (Cheeke , 1995).

Sfakianos et al., 1997, relatam que genisteína, quando administrada na dieta de ratas ovariectomizados, um modelo experimental utilizado para estudos de osteoporose pós-menopausa, previne a perda de constituintes do tecido ósseo.

A ação antiinflamatória de flavonóides foi demonstrada por Lee et al., 1982, e Lanni e Backer , 1985, que mostraram os efeitos de diversos flavonóides, dentre eles a naringenina, como inibidores da fosfolipase  $A_2$  na concentração de  $10^{-4}$  M, alterando o metabolismo do ácido araquidônico e inibindo a ciclooxigenase e a lipoxigenase.

Le Houx et al., 1993, relatam que chitosan, um produto natural derivado de quitina (2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glicose), funciona como uma resina trocadora de ânions e pode se ligar a ânions hidrofóbicos de ácidos biliares em um pH similar àquele encontrado no trato intestinal. Esta substância mostrou propriedades hipocolesterolêmicas em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Possuindo glicose em sua estrutura, se assemelha a outros carboidratos do tipo "goma guar", que é formada por polímeros de  $\beta$ -D-manopiranosila e cadeias laterais simples de  $\alpha$ -D-(1-4) galactopiranosila (Leite, 1993). A capacidade de "goma guar" em reduzir os lipídeos séricos tem sido relatada por Ide et al., 1991 e Evans et al., 1992 em animais, e, em humanos por Turner et al., 1996, Tuomilehto et al., 1989, Spiller et al., 1991. A maioria dos estudos em humanos apresenta redução de 10 a 15% em colesterol-LDL nos tratamentos de até três meses (Smith e Holm, 1982, Todo et al., 1990).

Levando-se em conta os diversos mecanismos e efeitos atribuídos aos flavonóides, particularmente aqueles relacionados com os níveis de glicose e de lipídeos, foi proposto o presente trabalho para verificar a influência da naringenina isolada e associada ao chitosan, sobre os níveis de lipídeos em coelhos hiperlipidêmicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizados coelhos albinos, adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio ( $2500 \pm 200$  g), que receberam ração comercial SOCIL, fornecida na proporção de 170g/dia, e água à vontade durante todo o experimento. Estes animais foram provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os animais permaneceram 5 dias para adaptação em gaiolas apropriadas, em área especial, com ventilação adequada. Para a realização do experimento, foram constituídos 5 grupos, contendo cada um 6 animais, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1	Ração
Grupo 2	Ração + Triton
Grupo 3	Ração + Triton + Chitosan
Grupo 4	Ração + Triton + Naringenina
Grupo 5	Ração + Triton + Chitosan + Naringenina

Para a indução da hiperlipidemia, foi administrado Triton WR 1339, via intraperitoneal, na dose de 300 mg/Kg de peso corporal, utilizando como veículo NaCl 0,9%. Após 20 horas da administração do Triton, foram fornecidos aos coelhos, via intraperitoneal, naringenina, na dose de 5 mg/Kg de peso corporal e chitosan, na dose de 30 mg/Kg de peso corporal. Para estes compostos, também foi utilizado como veículo o NaCl 0,9%. Decorridos 24 horas destas administrações, procedeu-se à coleta de amostras de sangue, que foram centrifugadas à 7100 x G por 15 minutos para obtenção do soro. As dosagens sorológicas utilizando-se Kits Laborlab foram feitas para colesterol e triacilglicerois seguindo o método de Henry, 1982, e para colesterol HDL o método de Lima et al, 1985. Para as quantificações utilizou-se espectrofotômetro da marca Hitachi.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos lipídeos em soro de coelhos encontram-se registrados nos Quadros I, II e III, expressos em mg/dL, com suas respectivas percentagens de variação.

Quadro 1 – Valores médios de colesterol ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton, e suas percentagens de variação.

Grupos	Colesterol	%de Variação
1-Ração	39,42 $\pm$ 1,94	
2-Ração + Triton	248,50 $\pm$ 3,56 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	117,62 $\pm$ 2,41 Ba	-52,67
4-Ração + Triton + Naringenina	85,47 $\pm$ 2,28 Bb	-65,61
5-Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	66,51 $\pm$ 2,19 Bc	-73,24

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ )  
A difere de B pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos no Quadro I, pode-se observar que o Triton induziu a hiperlipidemia em coelhos, elevando os níveis de colesterol em cerca de 6,3 vezes (Grupos 1 e 2). Os resultados indicam claramente que em relação aos níveis de colesterol, todos os tratamentos provocaram uma redução significativa, mas chitosan associado à naringenina apresentou a maior percentagem de redução, mostrando um efeito sinérgico entre estes compostos.

Quadro II – Valores médios de colesterol- HDL ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton e suas respectivas percentagens de variação.

Grupos	Colesterol-HDL	% de Variação
1-Ração	30,60 $\pm$ 1,73	
2-Ração + Triton	98,51 $\pm$ 1,66 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	95,49 $\pm$ 2,46 Aa	- 3,07
4-Ração + Triton + Naringenina	68,67 $\pm$ 1,59 Bc	-30,29
5-Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	84,69 $\pm$ 2,42 Bb	-14,03

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ )  
A difere de B pelo teste de Dunnett ( $P<0,05$ ).

Os resultados do Quadro II, mostram que o Triton elevou acima de 3 vezes, os níveis de colesterol-HDL ( Grupos 1 e 2). Sua análise indica que o Grupo 3 ( chitosan) apresentou o melhor nível de colesterol-HDL pelo Teste de Tukey, apesar da redução não ser significativa em relação ao Grupo 2, mas representa valores mais de duas vezes superiores ao Grupo 1. Isto é uma vantagem pois esta lipoproteína é a responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde é metabolizado.

Quadro III – Valores médios de triacilgliceróis ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton, e suas respectivas percentagens de variação.

Grupos	Triacilgliceróis	% de Variação
1-Ração	100,54 $\pm$ 0,92	
2-Ração + Triton	581,96 $\pm$ 9,52 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	262,52 $\pm$ 4,26 Ba	-54,89
4-Ração + Triton + Naringenina	206,64 $\pm$ 3,38 Bb	-64,49
5-Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	166,32 $\pm$ 2,27 Bc	-71,42

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ )  
A difere de B pelo teste de Dunnett ( $P<0,05$ ).

Os resultados do Quadro III, mostram que todos os tratamentos foram significativos em relação aos níveis de triacilgliceróis. Dentre eles, destaca-se o chitosan + naringenina que apresentou maior percentagem de redução (71,42%), observando seu efeito de sinérgico .

Trabalhos realizados com catequina, prunina e 5-O-glicosil hesperetina, administrados via intraperitoneal, apresentaram para triacilgliceróis na dose de 20 mg/Kg de peso corporal, redução de 20% para a catequina, prunina e a 5-O-glicosil hesperetina. Na dose de 10 mg/Kg de peso corporal, não houve

efeito para triacilgliceróis, embora para colesterol total tenha ocorrido uma redução significativa (Choi et al., 1991).

Quercetina e Taxifolina administrados via oral (misturados à ração) em ratos também apresentaram efeitos hipolipidêmicos, inclusive com efeito de excreção observado devido ao aumento de colesterol e ácidos biliares nas fezes (Itaya et al., 1992). Já a pulicarina reduziu significativamente os níveis de colesterol de soro sanguíneo (Sagittinoya et al., 1992).

Le Houx et al., 1993, mostraram o efeito de quitosana sobre a redução da atividade enzimática da HMG-CoA redutase em fígado de ratos, como um possível mecanismo de ação destas substâncias e Koehrlé et al., 1986, mostraram que flavonóides inibem a enzima desidrogenase iodotironina que converte  $T_4$  em  $T_3$ , o metabólito mais ativo dos hormônios da tireóide. Este hormônio na lipólise do tecido adiposo inibe a fosfodiesterase, que assim aumenta os níveis intracelulares de  $AMP_C$ . Este por sua vez, ativa a proteína quinase C, que atua sobre a lipase, ativando-a, e desta forma, aumenta a atividade hidrolítica dos triacilgliceróis.

Em conclusão, pode-se afirmar que naringenina, quitosana e sua associação, foram eficazes no controle do metabolismo lipídico. Estes efeitos hipolipidêmicos podem estar associados à inibição, pelo quitosana, da HMG-CoA redutase, com conseqüente redução da biossíntese de colesterol e pela ações dos flavonóides, como a naringenina, que aumenta a excreção de colesterol e ácidos biliares pelas fezes de animais experimentais. O quitosana é também capaz de exercer uma ação seqüestradora de sais biliares ao nível do tubo gastrointestinal, levando, conseqüentemente, à uma redução desses ácidos e de outros lipídeos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Agullo, G.; Gamet-Payrastre, L.; Maneti, S.; Viala, C.; Rémésy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoids structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosinase and protein kinase c inhibition. *Biochemical pharmacology*. 53: 1649-1657, 1997.

2-Cheeke, P. R. *Alimentacion y nutricion del conejo*. Editora Acribia, S.A. ., pp. 429, 1995.

3-Choi, J. S.; Yokosawa, T.; Oura, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J. Natural Products*, 54: 1, 218-224, 1991.

4-Evans, A. J.; Hood, R. L.; Oakemfull, D. G.; Sidhu, G. S. Relationship between structure and function of dietary fiber: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in rat. *Br. J. Nutr.* 68: 217-229, 1992.

5-Gohar, A. A. ; Elmazar, M. A.; Isolation of hypotensive flavonoids from chemopodium species growing in Egypt. *Phytoterapy Research* 11: 564-567, 1997.

6-**Henry, J.B.** - *Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais*. 16<sup>a</sup> Ed., I: 226-228, 1982.

7-**Ide, T.; Moriuchi, H.; Nihimoto, K.** Hypolipidemic effect of guar gum and its enzyme hidrolysate in rats fed highly saturated fat diets. *Ann. Nutr. Metab.* 35: 34-44, 1991

8-**Itaya, S.; Igarashi, K.** Effects of Taxifolin on the Serum Cholesterol level in rats. *Biosc. Biotech. Biochem.* 56 :9, 1942-1494, 1992.

9- **Koehrle, J.; Auf'mkolk, M. D.; Matthias, S.; Klaus, I.; Cody, V.; Hesch, R. D.** Iodothyronine deiodinase is inhibited by plant flavonoids. *Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss. Inc. pp. 359-371, 1986,

10-**Lanni, C.; Becker, E. L.** Inhibition of neutrophil phospholipase A<sub>2</sub> by p-bromphenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid 5,8,11,14 eicosatetrayenoic acid and quercetin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun* 76: 214, 1985.

11-**Lee, T. P.; Matteliano, M. L.; Middleton, J. R. E.**; Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholip metabolism. *Life Sci.* 31: 2765- 2768, 1982.

12- **Le Houx, J. G.; Grodin, F.** Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, Mar 1432:3, 1078-84, 1993.

13-**Leite, J. I. A.** *Mecanismo de Ação de Goma Guar sobre o metabolismo de colesterol*. Tese MS, UFMG, pp.124, 1993.

14- **Lima, A. O ; Soares, J.B; Greco, J.B; Gallizi, J; & Cançado J.R.** *Métodos de Laboratório Aplicado a Técnicas e Interpretação*. 6<sup>a</sup> Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1985.

15-**Mathur, K. S.; Singhal, S. S.; Sharma, R. D.** Effect of Bengal gram on Experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in Albino Rats. *J. Nutrition* 84: 201-204, 1964.

16-**Sagittinoya, G. V.; Eshfakoya, K. A.; Olimov, V.** Flavonoid Pulicarpin from *Pulicaria salvifolia* and its hypolipidemic activity. *Chemical of Natural compounds*. 128: 286-288, 1992.

17-**Sfakianos, J.; Coward, L.; Kirk, M.; Barnes, S.** Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *American Society for Nutritional Sciences*, 1260-1268, 1997.

18-**Sharma, R. D.** Effect of various isoflavones on lipid levels in triton treated rats. *Atherosclerosis*, 33 : 371-375, 1979.

19-**Siddiqui, M. T.; Siddiqui, M.** Hypolipidemic principles of *Cicer arietinum*: Biochanin A and Formonnetin. *Lipids*, 11: 3, 1975, 1996.

20-**Smith, U.; Holm, G.** Effect of a modified guar gum preparation of glucose and lipid levels in diabetics and health volunteers. *Atherosclerosis*, 45: 1-10, 1982.

21-**Spiller, G. A.; Farquar, J. W.; Gates, J. E.; Nichols, S. F.** Guar gum and plasma cholesterol. Effect of guar gum and oat fiber source on plasma lipoprotein and cholesterol in hypercholesterolemics adults. *Atherosclerosis and Thrombosis*, 11: 1204-1208,1991.

22-**Todd, P. A.; Benfield, P.; Goa, K. L.** Guar gum: a review of its pharmacological properties and use as a dietary adjunct in hypercholesterolaemia. *Drugs* 39: 917-926,1990.

23-**Tuomilehto, J.; Silvasti, M.; Manninem, V.; Uusitupa, M.; Aro, A.** Guar gum and gemfibrozil na effective combination in the treatment of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 76: 71-77,1989.

24-**Turner, P. R.; Tuomilehto, J.;L Haponem, P.; La Ville, A. E.; Shaika, M.; Lewis, B.** Metabolic studies on the hypolipidemic effect of guar gum. *Atherosclerosis*, 81: 145-150,1996.

**Ouro Preto, 21 de março de 2000**

À

Editoria da Revista Brasileira de Análises Clínicas  
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas  
Rua Vicente Licínio, 95 - Tijuca  
20270-340  
Rio de Janeiro

Prezados Senhores,

Tenho a satisfação de submeter à apreciação desta conceituada Revista o artigo “Efeitos de Chitosan e Naringenina sobre lipídeos no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton” , para fins de publicação. Sem mais para o momento apresento-lhe, minhas,

Cordiais Saudações,

Professor Tanus Jorge Nagem  
Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Da Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Morro do Cruzeiro  
35400-000- Ouro Preto Minas Gerais

## ESTIMATIVA DOS LÍPIDES TOTAIS NO SORO BASEADA NAS DETERMINAÇÕES DE COLESTEROL E/OU TRIGLICÉRIDES.

Daniela S. Gruber<sup>1</sup>; Adriana Pinho-Pinto<sup>2</sup>; Maria Cristina Guerra<sup>2</sup>; Marcelo Kikuti<sup>2</sup>; Aguinaldo José Nascimento<sup>3</sup>; Marileia Scartezini<sup>4</sup>; Vânia M. Alcântara<sup>4</sup> e Geraldo Picheth<sup>4</sup>

1. Farmacêutica-Bioquímica - monitora da Disciplina de Bioquímica Clínica da UFPR.
2. Farmacêuticos-Bioquímicos do setor de Bioquímica do Laboratório Frischmann Aisengart.
3. Professor Dr. da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Bioquímica - UFPR
4. Professores da Disciplina de Bioquímica Clínica do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

endereço para correspondência:

Prof. Geraldo Picheth  
Disciplina de Bioquímica Clínica  
Departamento de Patologia Médica  
Universidade Federal do Paraná  
Rua Prefeito Lothário Meissner, 3400  
Jardim Botânico  
80210-170 – Curitiba – PR

contato:

fone/fax: 0-xx-41-335-6773

e-mail: [gpicheth@zaz.com.br](mailto:gpicheth@zaz.com.br)

### Palavras-Chave:

Estimativa dos lípides totais; reação da sulfofosfovanilina  
colesterol; triglicérides

### TOTAL SERUM LIPIDS ESTIMATED BY TOTAL CHOLESTEROL AND/OR TRIGLYCERIDES

#### Key Words

Total serum lipids estimation, Sulfofosphovanillin reaction;  
Cholesterol; Triglycerides

## RESUMO

A concentração dos lípides séricos esta diretamente relacionada aos níveis de colesterol, triglicérides e fosfolípides na amostra. Estudamos através de análise de regressão, equações que possibilitem estimar os lípides totais através das concentrações séricas de colesterol e/ou triglicérides e desta forma substituir a determinação química pela sulfofosfovanilina, que apresenta elevada variabilidade analítica e utiliza reagentes corrosivos. Com amostras de soro de 112 indivíduos (51,2% do sexo feminino), duas equações para estimar os lípides totais séricos foram obtidas: lípides totais (mg/dL) = 1,145 x triglicérides + 452 ( $r^2 = 0,866$ ) e lípides totais (mg/dL) = 1,0 x (colesterol total + triglicérides) + 287 ( $r^2 = 0,876$ ). Quando os valores dos lípides totais quantificados pela sulfofosfovanilina foram comparados àqueles estimados pelas equações acima, utilizando como elementos preditores os triglicérides ou a soma destes com o colesterol total, não foram observadas diferenças significativas pelo teste “t” ( $p \geq 0,99$ ) em ambos os casos. O erro na preditibilidade dos lípides totais presente nas equações apresentadas, ‘é menor que a imprecisão da determinação química pela sulfofosfovanilina. A utilização de um elemento preditor (triglicérides) ou dois (colesterol + triglicérides) mostrou resultados semelhantes no presente estudo.

### Palavras-Chave:

Estimativa dos lípides totais;  
reação da sulfofosfovanilina  
colesterol;  
triglicérides

## SUMMARY

The total serum lipids concentration is highly correlated with the level of cholesterol, triglycerides and phospholipides in the sample. With aid of regression analysis we obtained equations that allowed estimation of the total serum lipids. We intended the substitution of the sulfophosphovanillin reaction, that have high analytical variability, by the use of cholesterol and/or triglycerides serum levels as predictors. Sample of 112 individuals (51,2% - female) was used and the following equations were obtained: total lipids (mg/dL) =  $1,145 \times \text{triglycerides} + 452$  ( $r^2 = 0,866$ ) and total lipids (mg/dL) =  $1,0 \times (\text{total cholesterol} + \text{triglycerides}) + 287$  ( $r^2 = 0,876$ ). When the estimated values for total lipids were compared by “t” test with those obtained by sulfophosphovanillin reaction no significative difference was observed using both, triglycerides or the sum of triglycerides with cholesterol ( $p \geq 0,99$ ). The experimental error for the total lipids estimation is lower than the error preconized for the sulfophosphovanillin method. The use of one predictor (triglycerides) ou two (cholesterol + triglycerides) showed similar results in the present study.

### Key Words

Total serum lipids estimation,  
Sulfophosphovanillin reaction;  
Cholesterol;  
Triglycerides

## 1. INTRODUÇÃO

Os lípides biológicos são compostos heterogêneos que apresentam em comum sua insolubilidade em água.<sup>7</sup> Estes compostos, solúveis em solventes orgânicos apolares, estão presentes no sangue como agregados moleculares associados à proteínas, chamados lipoproteínas, formas estas solúveis neste meio essencialmente aquoso.

No soro humano os principais lípidos são o colesterol (esterificado e livre), os triglicérides, os fosfolípidos, os ácidos graxos, os glicolípidos (cerebrosídeos), os álcoois de cadeia longa, os carotenóides, os hormônios esteróides, e as vitaminas lipossolúveis (A, D e E).<sup>9,10</sup> Sendo que os três primeiros representam a quase totalidade dos lípidos séricos em termos de concentração.

Vários procedimentos analíticos foram desenvolvidos para quantificar os lípidos séricos. Os primeiros métodos baseavam-se na extração dos lípidos da amostra biológica com solventes orgânicos apolares, seguindo-se de secagem e pesagem do material extraído (métodos gravimétricos). Posteriormente foram introduzidas metodologias com titulação, colorimetria ou turbidimetria realizadas sobre o extrato orgânico obtido da amostra. Todas estas metodologias exigiam múltiplas etapas, o que as tornava trabalhosas e muito susceptíveis a erros analíticos.<sup>6</sup>

Em 1937, Chabrol e Charonnat descreveram uma reação dos lípidos com ácido sulfúrico, ácido ortofosfórico e vanilina, a qual em 1962 foi modificada e popularizada para quantificação dos lípidos séricos, como a reação da sulfofosfovanilina por Zoellner e Kirsch.<sup>5</sup> Esta metodologia que sofreu modificações ao longo dos anos, rapidamente se tornou o método de escolha para os laboratórios clínicos, opção que persiste na atualidade, pela simplicidade de execução.<sup>4</sup>

Todos os métodos para a quantificação dos lípidos totais apresentam dois problemas: inespecificidade e elevado coeficiente de variação analítica (CVA; baixa reprodutibilidade). A dificuldade com a especificidade ocorre, além do processo analítico, pela própria definição de lípido ser baseada na solubilidade, o que permite compostos químicos de estruturas muito variadas serem abrigados na mesma denominação. A reação da sulfofosovanilina empregada pela maioria dos laboratórios clínicos, quantifica substâncias que apresentam duplas ligações na molécula, independente se o composto é classificado como lípido ou não. Em quantidades equivalentes compostos poliinsaturados produzem menos coloração que compostos monosaturados, presumivelmente devido a degradação dos primeiros a fragmentos menores no meio sulfúrico da reação. Compostos saturados simplesmente não produzem cor.

**1,6,10**

Com o desenvolvimento tecnológico, que possibilitou quantificar com confiabilidade os componentes lipídicos do soro isoladamente, como o colesterol e os triglicérides, a determinação dos lípidos totais tornou-se sem utilidade clínica. Borel e colaboradores afirmam que esta determinação deveria ser suprimida da lista de exames laboratoriais por não trazer informações sobre a natureza da hiperlipidemia e pela baixa sensibilidade.<sup>2</sup> Esta afirmação é corroborada por outros autores e pelo fato deste ensaio não ser citado na literatura internacional a mais de duas décadas.<sup>10</sup>

Não obstante aos problemas metodológicos envolvidos na quantificação dos lípidos totais e a obsolescência deste parâmetro na formação do diagnóstico, esta determinação ainda é solicitada em nosso meio.

Propomos, neste presente trabalho, um método para estimar os lípidos totais através das concentrações de colesterol total e/ou triglicérides.. Desta forma, esperamos oferecer resultados de quantificação dos lípidos totais, por estimativa, sem a necessidade de realizar a determinação química, enquanto persistem as solicitações clínicas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRA

Foram utilizados soros de 112 indivíduos, 51,2% do sexo feminino, com idade média de 49,9 anos (variando de 9 a 85 anos) escolhidos ao acaso da rotina.

### 2.2. MÉTODOS

As determinações de colesterol total e triglicérides foram realizadas em sistema de química seca (Johnson & Johnson, Vitros 550 e 250) com calibrações e controles realizadas segundo as recomendações do fabricante. As determinações de lípides totais foram realizadas pelo método da sulfofosfovanilina como descrito por Bauer.<sup>1</sup>

As análises de regressão e correlação, bem como o teste “t” para amostras não pareadas, foram os testes estatísticos utilizados.

## 3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Inicialmente foram estudadas as correlações entre os lípides totais e as determinações de colesterol total e triglicérides. Outra variável adicionada à análise foi a soma do valores de colesterol com os triglicérides. Estes dados encontram-se na tabela 01.

Tabela 01. CORRELAÇÃO ENTRE OS LÍPIDES TOTAIS E OS NÍVEIS DE COLESTEROL , TRIGLICÉRIDES E COLESTEROL + TRIGLICÉRIDES (COLTG)

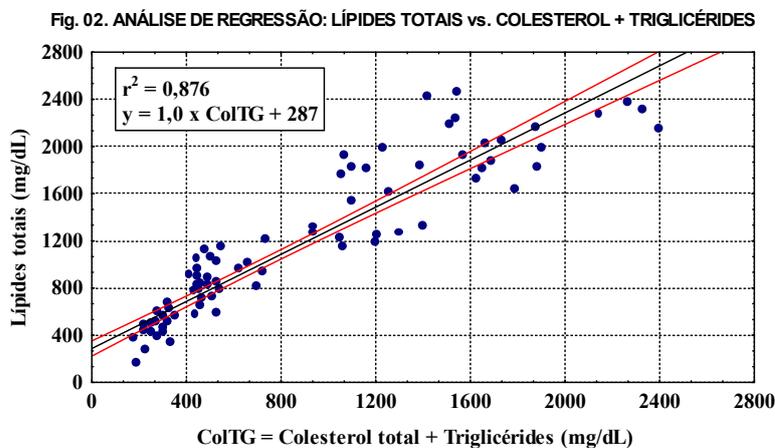
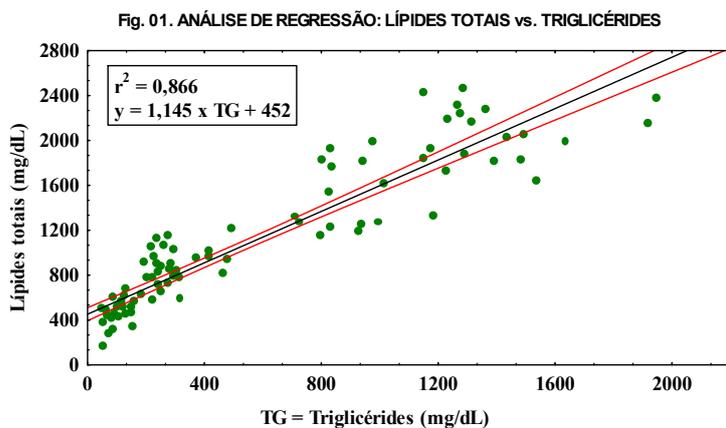
variáveis	Colesterol total	Triglicérides	COLTG
Lípides totais	r = 0,683 p = 0.000	r = 0,931 p = 0.00	r = 0,936 p=0.00

COLTG = colesterol total + triglicérides; r = coeficiente de correlação; p = probabilidade

A elevada correlação observada, entre os lípides totais e os demais parâmetros era esperada, uma vez que o colesterol e os triglicérides compõem juntamente com os fosfolípidos, os lípides quantitativamente importantes do soro. Com base na análise dos coeficientes de correlação ( $r$ ), foram selecionados os triglicérides e a soma destes com o colesterol (COLTG) para os estudos de regressão, ambos com  $r \geq 0,93$ .

A análise de regressão dos lípides totais com os triglicérides e com o COLTG estão ilustradas nas figuras 01 e 02.

### INTRODUZIR FIG. 01 e 02



Os dados obtidos nas retas de regressão, permite estabelecer para valores em mg/dL, as equações : lípides totais =  $1,145 \times \text{triglicérides} + 452$  e lípides totais =  $1,0 \times (\text{colesterol} + \text{triglicérides}) + 287$ , como formas de estimar os lípides totais utilizando, respectivamente, os níveis séricos dos triglicérides ou a soma dos níveis séricos de colesterol e triglicérides (COLTG).

Na análise de regressão entre duas variáveis, o valor  $1-r^2$  representa a variação ao acaso, a variabilidade que não é devida à variação concomitante das duas variáveis estudadas. Os valores de  $1-r^2$  podem ser calculados para os dados das figuras 1 e 2, respectivamente como 0,124 e 0,134. Portanto temos uma taxa de incerteza que varia entre 12 e 13%, perfeitamente aceitável devido à natureza do trabalho.

O erro inerente às equações propostas não é um óbice à utilização deste processo. A quantificação dos lípides totais pelo método da sulfosfovanilina, apresenta elevada variabilidade analítica (CVa), sendo que valores de 18 a 30% estão documentados.<sup>8</sup> Estudos da variabilidade analítica desenvolvidos durante este projeto, mostraram para o método utilizado valores de CVa de cerca de 15%.

Os estudos da comparação entre os resultados dos lípides totais pelo método da sulfosfovanilina com os obtidos pela estimativa com as equações propostas na análise de regressão, encontram-se na tabela 02.

Tabela 02. TESTE “t” PARA A DETERMINAÇÃO DOS LÍPIDES TOTAIS QUANTIFICADOS PELA SULFOFOSFOVANILINA COMPARADOS AOS PROCESSOS DE ESTIMATIVA PELOS NÍVEIS DE TRIGLICÉRIDES E PELA SOMA DESTES COM O COLESTEROL (COLTG)

tratamentos	média	dp	t	p
sulfosfosvanilina (controle)	1009,9	610,2	---	---
estimativa com triglicérides	1010,2	568,1	0,012	0,990
estimativa com COLTG	1009,9	571,4	0,004	0,996

número de amostras = 112; dp = desvio padrão; t = teste “t” de Student e p = probabilidade

Estes resultados mostram não haver diferença significativa a nível de 5% entre a medição analítica e os resultados obtidos pelas equações propostas.

CHEEK *et al.*, 1969 estudaram a determinação de lípidos totais através dos seus componentes majoritários e descreveram as equações: lípidios totais = 1,5037 x colesterol + triglicérides + fosfolípides e lípidos totais = 1,53 x colesterol + 1,13 x triglicérides + 0,607 x fosfolípides + 74,5.

Estas equações, no entanto diferem das obtidas neste trabalho, pela presença dos fosfolípides e por terem sido comparadas com procedimentos extrativos ou turbidimétricos e não pela reação da sulfosfosvanilina.<sup>3</sup>

É possível supor que procedimentos que estimem os lípidos totais que congreguem os três componentes lipídicos principais apresentem resultados melhores em relação a preditibilidade do que aqueles que contenham apenas um ou dois destes elementos.<sup>3,4</sup> No entanto a determinação dos fosfolípides não é realizada de forma rotineira em nossos laboratórios e a sua introdução na nossa proposta, resultaria na perda da praticidade. Também cabe ressaltar que neste estudo, a estimativa baseada apenas nos níveis dos triglicérides não mostrou diferença quando comparada com a soma dos triglicérides e colesterol, utilizada a muito tempo de forma empírica em alguns laboratórios.

Em resumo, nossos dados mostram que é possível estimar os lípidos totais séricos utilizando os níveis de triglicérides e/ou a soma dos níveis

séricos de colesterol e triglicérides. O erro gerado na previsibilidade dos valores de lípidos totais pelas equações propostas é menor que a imprecisão analítica inerente à metodologia da sulfofosfovanilina.

### **agradecimento**

Os autores agradecem ao **Laboratório de Análises Clínicas Frischmann Aisengart** pelo uso de amostras, reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

01. BAUER, John D. Clinical laboratory methods. 9 ed. Mosby:St. Louis, 1982, p.552-3.
02. BOREL, Jacques P.; CHANARD, Jacques; GOUGEON, Jacques; LEUTENEGGER, Marc; POTRON, Gérard; RANDOUX, Alain e ZEITOUN, Paul. Como prescrever e interpretar um exame laboratorial. Andrei Editora:São Paulo; 1984,p.81.
03. CHEEK, Chandler S. e WEASE, Dorothy F. A summation technic for sérum total lipids. **Clin.Chem.**, **15**(2):102-7, 1969.
04. CONNERTY, Harold V.; BRIGGS, Angelis R. e EATON JR, Eduard H. Simplified determination of the lipid components of the blood serum. **Clin.Chem.**, **7**(1):37-53, 1961.
05. FRINGS, Christopher S.; FRENDELY, Ted W.; DUNN, Ralph T. e QUEEN, Cecelia A. Improved determination of the total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. **Clin.Chem.**, **18**(7):673-4, 1972.
06. HENRY, Richard J.; CANNON, Donald C e WINKELMAN, James W. Química clínica - princípios y técnicas. 2ed. Editorial Jims:Barcelona, 1980,p.1435-41.
07. LEHNINGER, Albert L.; NÉLSON, David L. e COX, Michael M. Principles of biochemistry. 2 ed. Worth Publishers:New York, 1993, p.240-65.
08. Manual Técnico - Soro controle Control-lab. Lote RD, 1997.
09. NOGUEIRA, Durval M.; STRUFALDI, Bruno; HIRATA, Mário H.; ABDALLA, Dulcinea S.P. e HIRATA, Rosário D.C. Métodos de bioquímica clínica - técnica e interpretação. Pancast Editorial:São Paulo, 1990,p.201-5.
10. WEIDMAN, Stuart W. e SCHONFELD, Gustav Lipids and lipoproteins. IN: SONNENWIRTH, Alex C. e JARRET, Leonard (ED.) Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 8ed. Mosby:St.Louis;1980,p.277-9.

ESTIMATIVA DOS LÍPIDES TOTAIS NO SORO BASEADA NAS DETERMINAÇÕES DE COLESTEROL E/OU TRIGLICÉRIDES.

TOTAL SERUM LIPIDS ESTIMATED BY TOTAL CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDES

Key Words

TOTAL SERUM LIPIDS ESTIMATION

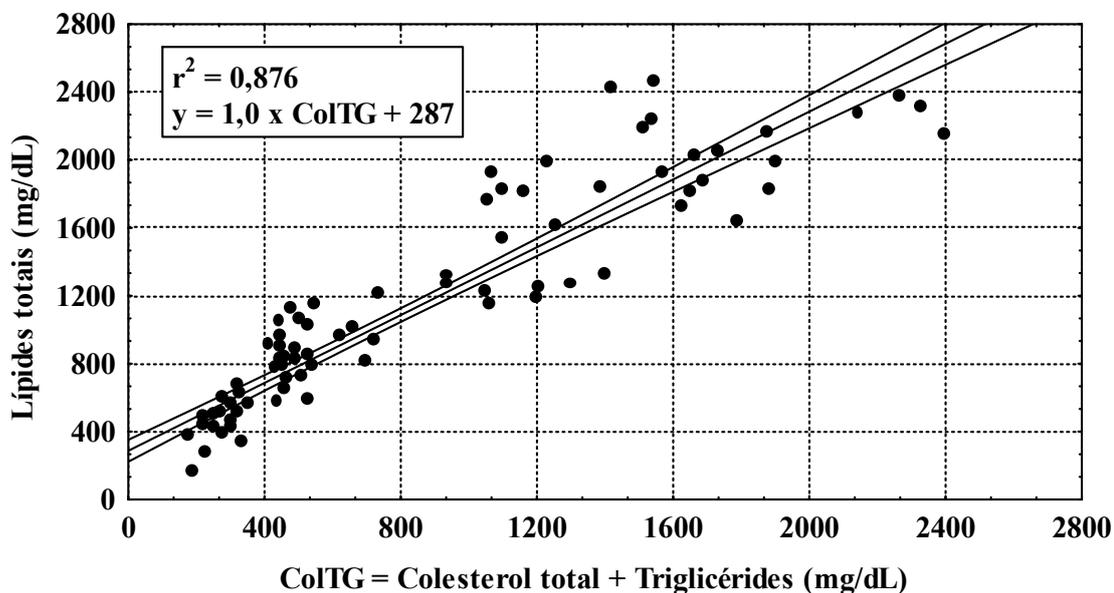
SULFOPHOSPHOVANILLIN REACTION

Estimativa dos lípides totais do soro

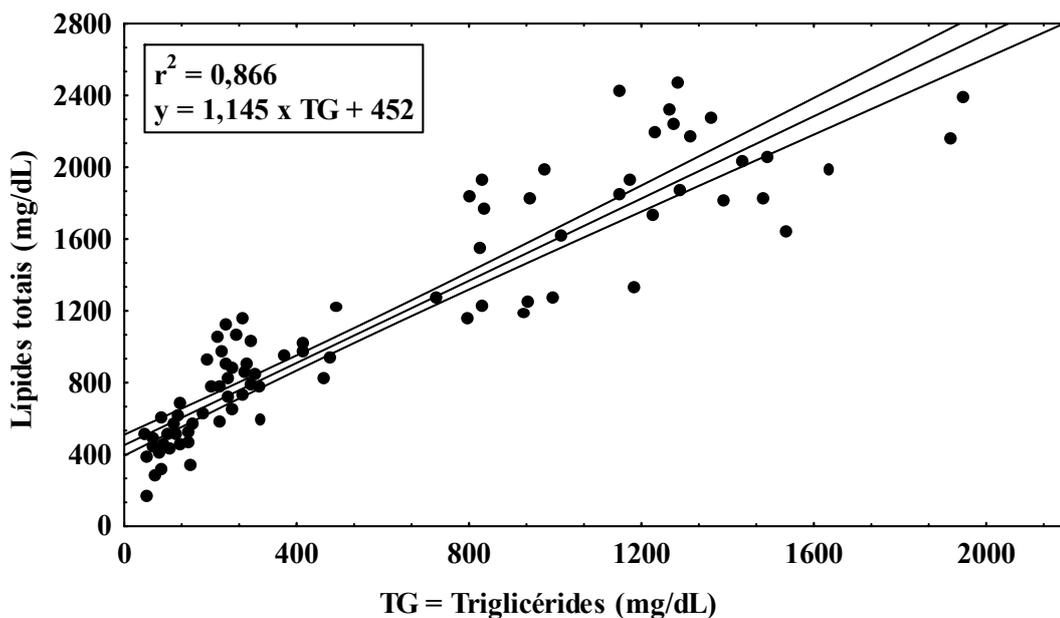
Reação da sulfofosfovanilina

TOTAL SERUM LIPIDS ESTIMATED BY CHOLESTEROL AND/OR TRIGLYCERIDES

**Figura 01. ANÁLISE DE REGRESSÃO ENTRE AS DETERMINAÇÕES DOS LÍPIDES TOTAIS E A SOMA COLESTEROL TOTAL + TRIGLICÉRIDES (CoITG)**



**Figura 02. ANÁLISE DE REGRESSÃO ENTRE AS DETERMINAÇÕES DOS LÍPIDES TOTAIS E OS TRIGLICÉRIDES (TG)**



# **O Papel da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)**

ADRIANO GUARDINI<sup>1</sup>; JAHIEL M. DE S. TAVARES<sup>2</sup>; MAURÍCIO PACHECO DE ANDRADE<sup>3</sup>

1.2 Farmacêutico e bioquímico do Laboratório Escola da FUNDEPE - Universidade do Vale do Itajaí – Itajaí-SC  
3 Farmacêutico e bioquímico do Laboratório ALVARO – Foz do Iguazu – PR

## **RESUMO**

A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) é um hormônio circulante em humanos, onde desempenha importante papel fisiológico. Sua estrutura é genética e molecularmente conhecida como uma cadeia bipeptídica com subunidades alfa e beta. O presente trabalho visa determinar o papel do hormônio na imunomodulação da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) na inibição da transmissão vertical, bem como a redução do Sarcoma de Kaposi em paciente com SIDA utilizando o hormônio. O trabalho revisa achados bibliográficos atualizados no sentido de tentar estabelecer uma provável correlação entre a presença de concentrações séricas do hormônio a condições gestacionais, e um possível papel protetivo deste quanto à transmissão vertical do VIH bem como a outras patologias associadas a SIDA. Os resultados obtidos em bibliografias sugerem um efeito positivo na redução do Sarcoma de Kaposi, uma redução da carga viral em indivíduos infectados pelo VIH além de sugerir uma proteção ao feto quanto à transmissão vertical intra-uterina.

## **ABSTRACT**

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) is a circulating hormone in humans, where it has an important physiological role. Its structure is genetically and biochemically known, and, it is mainly founded as a two peptide chain, with alpha and beta subunits. Present study try to show hormone's role on immunomodulation of infection by Human Immunodeficiency Virus (HIV), in reduce rates of its vertical transmission, and in clinical improvement of Kaposi's Sarcoma in individuals with AIDS using hCG. The work reviews bibliographic data trying to found a correlation between increase in serum concentrations of hormone in gestational conditions and a possible role in protecting against viral vertical transmission and another clinical conditions AIDS-associated. The results suggest a positive effect in reducing of Kaposi's Sarcoma, reduction on viral load and a possible fetal protection against vertical intrauterin transmission.

## INTRODUÇÃO

Até há poucos anos, a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) era vista como uma doença fatal e inevitavelmente progressiva. Nos anos recentes, os avanços em pesquisas com SIDA têm sido capazes de modificar esta visão sombria e fatalista. Primeiramente, com o advento de drogas antiretrovirais eficazes, com o uso de combinações sinérgicas de drogas. Isto tem proporcionado um significativo aumento na potência do ataque antiviral e, pelo menos até o presente, reduzido o desenvolvimento de novos padrões de resistência aos antivirais, uma consequência inevitável do uso de monoterapias. As estratégias antivirais modernas têm mostrado capacidade de converter a infecção pelo VIH em uma condição patológica crônica, controlável por terapia de longo prazo. (FLEXNER, 1998. CLERCQ, 1995)

O segundo avanço tem sido demonstrado pelas recentes descobertas de que certos indivíduos possuem mecanismos naturais de resistência ao vírus, ou mesmo podem, ao tornar-se infectados, ser capazes de controlar a infecção efetivamente, de modo que se apresentam assintomáticos por indefinidos períodos de tempo. Embora estes casos sejam ainda raros, espera-se que com o seu estudo, novos conhecimentos sobre os mecanismos naturais para a resistência, ou o controle da infecção possam auxiliar o desenvolvimento de terapias de suporte, novos antivirais e até vacinas contra o VIH.

Recentes trabalhos têm demonstrado que o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresenta atividade antiretroviral, com atividade sobre a transcriptase reversa do VIH, bloqueando a transmissão viral e prejudicando o mecanismo de ação do vírus. (BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995. SWAPAN; et al, 1997). O hormônio parece também possuir ação inibitória e induzir a melhora clínica em relação ao sarcoma de Kaposi (KS), enfermidade relacionada a um Herpesvirus em pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA). (LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995)

O hCG parece poder inibir o VIH, impedir o desenvolvimento do KS e ainda ter um efeito protetor quanto à transmissão vertical (mãe-feto) intra-uterina. Os estudos têm avançado de maneira a propor que um fator associado ao hCG (HAF), possa ter a atividade inibitória e protetiva em relação ao VIH. (GILL; et al, 1997. LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995)

Preende-se desta forma, estabelecer uma provável ligação entre os elevados níveis de hCG encontrados na gestação e a proteção contra a transmissão vertical do vírus, o efeito imunomodulador na transmissão viral e inibição do KS.

# 1 GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA

## 1.1 Revisão Bibliográfica

O hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), componente essencial à manutenção da gestação, é sintetizado tipicamente pelas células sincitiotrofoblásticas da placenta. (BURTIS; et al, 1986). Quantidades mínimas desta substância também são sintetizadas na glândula pituitária de homens e mulheres não grávidas e, como outros hormônios pituitários, são secretadas de modo pulsátil. Contudo, encontra-se relatos de outras localizações de substâncias similares ou iguais ao hCG, como testículos, cólon, fígado, tecidos fetais e rins. (BURTIS; et al, 1986. BRAUNSTEIN et al, 1979. GOLDSMITH; et al, 1983) Ainda, pode-se encontrar uma ampla distribuição do hormônio ou suas subunidades em líquidos biológicos, especialmente materiais provenientes de gestantes de primeiro trimestre. Estas pesquisas baseiam-se em trabalhos que utilizam anticorpos, o que pode explicar uma eventual reação cruzada com substâncias hCG-similares. (DE MEDEIROS; et al, 1992. HUHTANIEMI; et al, 1978)

Há descrições sobre as diversas localizações para receptores que podem ser ligados por moléculas de hCG ou suas subunidades. Tais localizações são pele, cérebro, tecido testicular, útero, endométrio, miométrio e músculo liso vascular (em região pélvica, principalmente). (PABON; et al, 1996. ZICIK; et al, 1992)

Algumas patologias neoplásicas podem determinar a produção ectópica do hormônio. Isto é visto em neoplasmas de ovário, testículo, pele, bexiga, cérvix, trato gastrointestinal, pulmão, seio e principalmente nos coriocarcinomas uterinos. (WALLACH, 1996. DOI; et al, 1996) Esta presença, pode ser justificada como sendo associada aos genes *rho*, pertencentes à família dos oncogenes *ras*. (MADAULE e AXEL, 1985)

O hCG foi a primeira proteína associada à gravidez a ser descoberta, na década de 60, e é amplamente utilizado como marcador desta condição. Atualmente, utiliza-se no nível clínico-laboratorial, e sua determinação quantitativa em vários líquidos, principalmente soro, para diagnóstico e acompanhamento de gravidez ectópica, acompanhamento gestacional (estimar a idade gestacional e triagem para síndrome de Down), diagnóstico e acompanhamento de molas hidatiformes, abortos espontâneos, e como marcador tumoral para uma série de neoplasias, como o coriocarcinoma, carcinoma testicular e outros tumores trofoblásticos gestacionais. Na prática clínico-terapêutica, preparados de hCG podem ser utilizados em tratamentos de infertilidade (na indução à ovulação e manutenção da gravidez), estimulação da espermatogênese e hipogonadismo hipogonadotrófico. Ainda, resultados promissores têm sido obtidos no tratamento de KS. (PESCE e KAPLAN, 1991., BOURINBAIAR e LEE-HUANG; 1995, BOURINBAIAR et al, 1997. WALLACH, 1996. BURTIS; et al, 1986. GILMAN; et al, 1991)

### 1.1.1 Histórico

A molécula da gonadotrofina coriônica humana (hCG), sua caracterização, codificação gênica e a descrição de suas funções biológicas tem sido objeto de estudo desde a década de 60. (POLICASTRO; et al, 1983. TIETZ, 1965. BASSET e REISS, 1971. DE MEDEIROS; et al, 1992. LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995) Várias espécies e até mesmo alguns microorganismos e certos vertebrados demonstraram poder produzir moléculas hCG-similares, sugerindo um papel para a molécula durante a evolução. De fato, pode-se apreciar esta produção em certas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Saccharomyces cerevisiae*. (BOURINBAIAR E LEE-HUANG, 1995)

Muitos experimentos comprovaram uma associação estreita entre a presença de determinados tumores e o aumento de níveis circulantes de hCG. (RUSSO; et al, 1990) Atividades imunomoduladoras da molécula já eram pesquisadas, conforme se observa nos trabalhos de BOURINBAIAR. (BOURINBAIAR e NAGORY, 1992) O hCG foi primeiramente proposto como molécula portadora de atividade antitumoral quando observou-se a diminuição de um carcinoma experimental em ratas grávidas. (RUSSO; et al, 1990) Triagens clínicas levadas a cabo posteriormente não obtiveram resultados consensuais, embora, no geral, tenha-se verificado esta atividade antitumoral do hCG. (BOWLER; et al, 1995. BOURINBAIAR et al, 1997. GILL; et al, 1996) É, no presente, evidente que o hormônio não é somente associado à gravidez e pode estar envolvido em outros efeitos fisiológicos. (BOURINBAIAR; et al, 1997)

A atividade imunomoduladora tornou-se objeto de maior interesse desde que, em 1995, GALLO e colaboradores publicaram os resultados de um interessante trabalho ocorrido a partir de um engano de laboratório. (LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995) Em resumo, a equipe buscava obter dados estudando uma população transgênica murina suscetível ao desenvolvimento de sarcoma da Kaposi (KS). Durante o estudo foram colocados acidentalmente em contato indivíduos machos e fêmeas. Posteriormente, notou-se que alguns indivíduos da linhagem não desenvolviam KS. Apurou-se que estes indivíduos eram fêmeas em início de gestação. Após a reprodução deste achado, foi pesquisada a capacidade de urinas provenientes de mulheres no primeiro trimestre de gestação em inibir o desenvolvimento *in vitro* de células neoplásicas envolvidas no KS. Ao analisar-se a composição de preparados de hCG comerciais, percebeu-se que estes eram provindos de urinas concentradas de gestantes de primeiro trimestre. Foram testadas *in vitro* estas preparações, e a partir destes resultados, possibilitou-se triagens clínicas *in vitro* com pacientes de SIDA portadores de KS. Estes achados, então, sugeriram a necessidade de maiores estudos sobre possíveis capacidades imunomoduladoras e mesmo antivirais do chamado HAF (fator associado ao hCG), correlacionado a pacientes com SIDA (GILL; et al, 1997. LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995)

### 1.1.2 Caracterização Molecular e Genética

O hCG é um hormônio glicoprotéico (possui a maior proporção de carboidratos entre as proteínas humanas) de natureza heterodimérica, composto por dois peptídeos ligados não covalentemente, à subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . As cadeias heterodiméricas contêm quantidades variáveis de carboidratos, como D-galactose, ácido siálico, D-manose e ácido N-acetilneuramínico, sendo este último essencial para a atividade biológica do hormônio.

A seqüência de aminoácidos da subunidade  $\alpha$  é quimicamente relacionada a hormônios gonadotróficos possuindo grande homologia com estes, enquanto a subunidade  $\beta$  tem características químico-biológicas específicas. Quando o dímero é dissociado, a atividade hormonal é aparentemente reduzida. Há um único gene que codifica para a subunidade alfa de quatro hormônios glicoprotéicos da glândula pituitária (TSH, LH, FSH e hCG), localizado no cromossomo 6. Esta subunidade contém 92 aminoácidos, duas cadeias de carboidratos laterais e 5 pontes dissulfeto (PESCE e KAPLAN, 1991. PIERCE, 1971 *apud* BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995. SWAPAN; et al, 1997).

No cromossomo 19 encontra-se uma família de 7 genes com potencial para a codificação do  $\beta$ -hCG, embora 3 genes estejam mais objetivamente associados a esta produção. Esta subunidade é composta de 145 aminoácidos e possui 6 cadeias de carboidratos laterais e seis pontes dissulfeto. As subunidades  $\beta$  do hCG e do LH possuem grande similaridade, sendo difícil diferenciá-las analiticamente. Os primeiros 114 aminoácidos da cadeia  $\beta$  do hCG e LH possuem uma homologia de 86%, havendo uma diferença em apenas 16 resíduos. No entanto, a porção carbóxi-terminal (CT) do  $\beta$ -hCG é única do hormônio, uma vez que esta extensão não está presente no  $\beta$ -LH. Ocorre uma distinção entre os dois hormônios nos 30 aminoácidos carbóxi terminais da cadeia  $\beta$  do hCG. (POLICASTRO; et al, 1983. BOURINBAIAR e LEE HUANG , 1995)

O hCG pode ser encontrado nas formas heterodimérica, subunidade beta hCG livre e na forma “nicked” (forma que perdeu algumas ligações peptídicas, na subunidade beta hCG, perde-se ligações entre os resíduos 47 e 48 e entre 44 e 45). Destas formas, a mais ativa é a forma heterodimérica. Investiga-se a possibilidade das outras frações possuírem atividades em algum nível. (COLE; et al, 1991)

### 1.1.3 Bioquímica e Fisiologia do Hormônio

Do ponto de vista fisiológico, o hCG possui um importante papel na manutenção da função do corpo lúteo durante as primeiras semanas da gravidez. O hCG é um derivado cerebral semelhante ao LH, e acredita-se que a parte que se liga à célula exerce diretamente seus efeitos ligando-se à porção do receptor para hCG/LH pertencente à família dos receptores para proteína G unindo-se ao polipeptídeo na membrana plasmática. (BOURINBAIAR e LEE HUANG, 1995; BOURINBAIAR et al, 1997. ALBINI et al, 1997) Alguns estudos baseados na resposta das células uterinas ao hCG demonstraram que as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  livres são biologicamente inertes. (SWAMINATHAN, 1970 *apud* BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995) Relacionando a estrutura e a função parece que ambas as subunidades são necessárias para interação com receptores e há dois diferentes domínios de peptídeos em cada subunidade responsáveis pela ligação ao receptor e atividade biológica. (SEGALLOF; et al, 1990. REICHERT; et al, 1991. BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995)

### 1.1.4 Papel Imunológico

Estudos relatam que o hCG é um hormônio imunomodulador à gestação. Um receptor de 50 Kd com afinidade para o hCG foi descoberto em linfócitos T humanos. (LIN; et al, 1995. BOURINBAIAR; et al, 1997) A presença deste receptor em células imunocompetentes pode explicar o fato de quantidades picomolares de hCG exerçam excelente estímulo quimiotático em linfócitos T, monócitos e neutrófilos. (REINISCH; et al, 1994. BOURINBAIAR; et al, 1997) ALEXANDER e colaboradores, em 1998, demonstraram que, em resposta a algumas citocinas, células mononucleares podem secretar hCG, principalmente linfócitos NK e monócitos.

O hCG foi também proposto como uma proteína anti-tumoral por RUSSO e colaboradores em 1990 ao observar que o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno, um indutor de carcinoma de mama, não induzia um carcinoma experimental em ratas grávidas, o que levou a desconfiar da nova propriedade do hCG. (RUSSO; et al, 1990. BOURINBAIAR; et al, 1997) Triagens clínicas levadas a cabo posteriormente não obtiveram resultados consensuais, embora, no geral, tenha-se verificado esta atividade antitumoral do hCG. (BOWLER; et al, 1995. HARRIS, 1996. GILL; et al, 1996)

Outro possível envolvimento imunológico do hCG é a possibilidade de apresentar atividade antiretroviral. O hCG tem sido recentemente descrito como um supressor *in vitro* da atividade da transcriptase reversa do VIH em células cronicamente infectadas bloqueando a transmissão viral resultante do contato célula-célula entre linfócitos carregados de vírus e trofoblastos da placenta. Além disso, parece dificultar ou prejudicar internamente o mecanismo de ação viral. As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do hCG parecem inibir a síntese da proteína gag p24 do vírus dentro de linfócitos ACH-2 e monócitos U1 (BOURINBAIAR, 1994, BOURINBAIAR; et al 1997. SWAPAN; et al, 1997), sendo que a fração  $\beta$  parece exercer maior atividade. (BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995) Apesar de efeitos *in vitro* terem sido experimentalmente obtidos, ainda não há indícios de que possa haver alguma ação antiviral *in vivo*. (BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995)

Contudo, acredita-se que o hCG, direta ou indiretamente, inibe a replicação do VIH. Os efeitos inibitórios podem ter aplicações clínicas, sendo que os níveis fisiológicos humanos podem ser fator responsável pelo baixo nível de transmissão do VIH de mulheres para crianças. (SWAPAN; et al, 1997) A imunidade materna durante a gestação não parece ser comprometida e as gestantes infectadas pelo VIH progredem para a SIDA mais lentamente, quando comparadas a mulheres não gestantes. É bem possível que o hCG e outros fatores da gestação possam estar atuando de modo a inibir a replicação viral *in vivo* e também contribuir diminuindo a transmissão do VIH no útero.

A atividade máxima da inibição viral tem sido demonstrada em uma faixa de 10-100 ng/mL, o que corresponde aos níveis fisiológicos de hCG. À concentração das subunidades deve corresponder aos níveis sanguíneos de hCG das mulheres gestantes, pois doses muito elevadas podem causar um aumento na produção viral. Esta contradição entre estímulo e inibição pode ser explicada pela capacidade de diferentes domínios do hCG, promoverem inibição e estímulo. (ALBINI; et al, 1997) Apesar de dados confirmarem um efeito do hCG sobre a replicação viral o mecanismo pelo qual o hCG inibe a transcrição do VIH ainda não está estabelecido. (BOURINBAIAR e LEE-HUANG, 1995. SWAPAN; et al, 1997) Uma possível hipótese para esta inibição seria a produção de danos em produtos que atuam na regulação de elementos do VIH-LTR,

outra possibilidade seria a ativação dos produtos ativadores de mediadores celulares, tal como citocinas, linfocinas ou outros hormônios pelo hCG e/ou suas subunidades. (SWAPAN; et al, 1997)

## 1.2 Transmissão Vertical do VIH

Estimativas americanas indicam que as mulheres representam 13% dos casos de SIDA sendo que destas 75% estão em idade reprodutiva. (INFOC, 1996. VERONESI e FOCACCIA, 1998) Estudos na América do Norte e Europa relatam que 0,1% a 0,3% das mulheres em período gestacional estão infectadas pelo vírus VIH. (ANDIMAN, 1998) Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 90% das infecções pediátricas são causadas pela transmissão vertical (mãe para a criança). (CARMICHAEL, 1997) Estima-se no Brasil que 80% a 90% das crianças menores de 13 anos infectadas pelo VIH contraíram o vírus através da transmissão vertical. (CAMPOS, 1995) Estas crianças perfazem em torno de 700 novos casos por ano nos últimos 5 anos.

A transmissão vertical do VIH, segundo diversos estudos, pode ocorrer em 15% a 30% das gestações em que a mulher esta infectada pelo vírus, estes dados tem uma variabilidade de acordo com o local em que é pesquisado. (DAVIS, 1995; JACQUES, 1997. BROCKLEHURST, 1997. ANDIMAN, 1998. CRAVEN; et al, 1994. AIDS Treatment Update, 1997)

A mãe infectada pode transmitir o VIH para o feto ou recém nascido através da exposição ao vírus durante a gestação, no momento do parto devido ao intercâmbio perinatal de fluidos (sangue e secreções) entre a mãe e a criança ou através do aleitamento. (INFOC, 1996. VERONESI e FOCACCIA, 1998. MAIA, 1997. BURGARD; et al, 1992. KRIVINE; et al, 1992. AIDS treatment uptake, 1997. BROCKLEHURST, 1997. FLEXNER, 1998)

Rouzioux e colaboradores observaram que a infecção neonatal ocorre 35% no útero e 65% na hora do parto. KIGALI e colaboradores relatam uma transmissão de 25,3%, destas 7,7% ocorreriam no útero e 17,6% durante o parto ou após o parto. Os dados levando em conta o período de amamentação não são tão claros estima-se que risco de transmissão aumente sej cerca de 14%. (ROUZIOUX; et al, 1993. SIMONON; et al, 1994. JACQUEZ, 1997. SULLIVAN; et al, 1997) O mecanismo pelo qual ocorre a infecção transplacentária pelo VIH ainda não é conhecido. (BURGARD et al, 1992. BLANCHE et al, 1989. ANDIMAN, 1998. CRAVEN; et al, 1994) Atualmente, muitas investigações confirmam que a criança pode apresentar cultura positiva nas primeiras 48 horas após o nascimento, tendo sido infectadas no útero. (SULLIVAN; et al, 1997. JACQUES, 1997. ROUZIOUX; et al, 1993) A maioria dos recém nascidos filhos de mulheres soropositivas para o VIH, não são infectadas no útero. (BOURINBAIAR e NAGORY, 1992) A manutenção da saúde fetal até a época do nascimento sugere que fatores relacionados a gestação possam proteger o feto. (BOURINBAIAR e NAGORY, 1992. SWAPAN; et al, 1997)

Diversos fatores, como uma contagem de CD8 maior que  $1,8.10^9 / L$ , contagem de CD4 inferior a  $0,6.10^8 / L$ , antigenemia p24, inflamação da membrana placentária, febre por mais de 30 dias e curiosamente níveis de hemoglobina inferiores a 8,5g/dL, podem contribuir para o aumento no risco da transmissão vertical (CRAVEN; et al, 1994). Outro fator é relacionado ao grau de imunodeficiência materna, (ROUDIOX, 1993. JACQUEZ, 1997) ocorrendo um aumento no risco de transmissão para até 40% quando a

mulher apresenta sintomas da infecção há mais de um ano, contribuindo com a idéia que a transmissão também está correlacionada com a carga viral materna (JACQUES, 1997. CRAVEN; et al, 1994) Vários estudos têm demonstrado que altos níveis de RNA viral contribuem para o aumento do risco de transmissão vertical. (JACQUES, 1997) Estudos em desenvolvimento sugerem que o risco da transmissão vertical pode ser aumentado em casos de deficiência materna de vitamina A e uma suplementação alimentar poderia diminuir o risco. (BOARD, 1997. BROCKLEHURST 1998; ST. LOUIS; et al, 1993)

Estratégias vêm sendo adotadas para prevenir e reduzir a transmissão vertical, incluindo técnicas para diminuição da carga viral materna, eliminação da viremia durante a gestação, a prevenção da transmissão durante a gestação e trabalho de parto. Algumas maneiras de evitar a infecção neonatal incluem a utilização de medicamentos antiretrovirais como o zidovudine (AZT), imunoprofilaxia, evitar procedimentos invasivos como amniocentese, e a utilização de métodos de controle da infecção. O uso do AZT pode diminuir a transmissão vertical através da redução da viremia plasmática materna, aumentando também a concentração sérica do medicamento no feto, podendo ser associada a efeitos benéficos na prevenção da transmissão. (CRAVEN; et al, 1994. BROCKLEHURST, 1998. ANDIMAN, 1998. BOARD, 1997) Muitas drogas antiretrovirais conseguem atravessar a placenta tendo um potencial para provocar efeitos adversos, teratogênico ou carcinogênico, sendo desta forma recomendada cautela no uso de terapia com medicamentos inibidores de protease e inibidores da transcriptase reversa, em pacientes em período gestacional. (SANDE; et al, 1993. GULICK; et al, 1997. ANDIMAN, 1998)

Mais recentemente fora demonstrado que o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), produzido pelos trofoblastos placentários, parece exercer um efeito na replicação do VIH, inibindo sua proliferação, tendo sido caracterizado como uma possível nova classe de drogas antivirais naturais. (BOURINBAIAR, 1992 *apud* 1995, BOURINBAIAR; et al, 1997. LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1998)

### 1.2.1 Mecanismos de Resistência

De acordo com estudos da AIDS AS publicados pela Natural Resistance to HIV/AIDS em 1998, os mecanismos de resistência naturais ao VIH podem ser considerados em dois níveis: aqueles que permitem ao indivíduo resistir à infecção com o vírus e aqueles que após a infecção retardam ou impedem a progressão do quadro clínico da SIDA, permanecendo em estado de portadores subclínicos.

Os indivíduos pertencentes ao primeiro grupo são aqueles repetidas vezes expostos à possibilidade de infecção pelo VIH e permanecem negativos por qualquer parâmetro laboratorial utilizado. Estudos abordam neste grupo algumas prostitutas em Nairobi e Gambia, homens homossexuais de Los Angeles, parceiros de longo prazo de soropositivos, e crianças soronegativas de mães VIH-positivas.

A transmissão do VIH é ineficiente quando comparada a outras viroses humanas. É difícil estabelecer com que frequência exposições ao VIH que falham em estabelecer infecções, são devidas a resistência ou meramente parte da dificuldade intrínseca do vírus em realizar transmissão (aspectos como o inóculo mínimo, por exemplo).

Dois tipos de resistência à infecção parecem ocorrer: o devido a mutações em co-receptores utilizados pelo vírus para penetrar nas células, o que, apesar de ocorrida a infecção, permite ao indivíduo ser

capaz de montar uma resposta imune vigorosa e efetiva que permita a erradicação da infecção (embora possa se imaginar um estado de latência de longuíssimo prazo).

Os indivíduos que possuem mutações em nível de co-receptores, como por exemplo os CCR5 (cerca de 1% dos caucasianos são homozigotos e 15-20% heterozigotos para a mutação), receptores de citocinas, apresentam alterações na cadeia protéica em sua fração externa à membrana. Sabe-se que o VIH, em suas populações trópicas para macrófagos (M-tropic) necessita uma ligação simultânea entre o CCR5 e o CD4 para seu ingresso na célula. Quando o indivíduo possui esta alteração, o vírus torna-se incapaz de penetrar nas células e completar seu ciclo reprodutivo, sendo assim evitado o processo infeccioso. Esta população com tropismo para macrófagos parece ser a população predominante em estágios iniciais da infecção. Bloqueando a ação desta população, o processo infeccioso torna-se inviável. Desta forma, os indivíduos homozigotos para esta alteração estão presentes no grupo dos “resistentes à infecção”, e seus linfócitos e monócitos são resistentes à infecção induzida *in vitro*.

Outro fator inclui parceiros sexuais de indivíduos VIH-positivo que permanecem soronegativos, por exemplo, quando o paciente contraiu o VIH através de sangue ou derivados sanguíneos, são relatados alguns casos de crianças nascidas de mães soropositivas e que no entanto permanecem soronegativas. Contudo, o pequeno número de exemplos para definir o instante da exposição ao VIH fornecem poucas oportunidades para o estudo da resistência ao VIH.

A resistência natural a infecção e o progresso VIH/SIDA podem ser considerados em diferentes aspectos relacionando a resistência à infecção e a indivíduos infectados que não progridem para a SIDA. Alguns grupos de indivíduos expostos ao VIH permanecem soronegativos, estes indivíduos em geral tem história de exposição devido a numerosas atividades de risco.

Duas formas de resistência à infecção pelo VIH têm sido descritas, uma mutação em co-receptores utilizados pelo VIH para estabelecer a infecção ou através de uma resposta imune vigorosa e efetiva de alguns indivíduos e fatores ligados ao próprio vírus.

Alguns grupos de indivíduos não progridem para a SIDA devido a uma resposta imune quantitativamente e qualitativamente mais potente e efetiva a fim de controlar a infecção pelo VIH. Altos títulos de anticorpos neutralizantes têm sido encontrados nestes pacientes.

Outros indivíduos infectados pelo VIH não progridem para a SIDA, estes indivíduos VIH-positivos não fazem uso de terapia antiretroviral e até então permanecem clinicamente sem manifestações, podendo ter uma função imune razoável com elevada e estável contagem de linfócitos T CD4+ permanecendo durante vários anos sem sinais de imunossupressão ou evidências de progressão a SIDA. Um dos fatores que parece influenciar para a baixa carga viral plasmática do VIH, se deve à possibilidade de defeitos genéticos que conferem uma atenuação do vírus. Contudo, importantes estudos associados a possíveis defeitos genéticos em pacientes que por longo tempo não progridem para a SIDA apresentam um defeito no gen *nef*, um importante gen regulatório do VIH. Estudos têm revelado que o defeito no *nef* demonstra uma não apresentação de sintomas de SIDA e pode permanecer baixa a carga viral e normal a contagem de linfócitos CD4+. Isto atenta para o fato que descobrindo a causa do defeito poderá ser possível a produção de uma vacina para o VIH.

Ainda não estão totalmente elucidado os fatores que levam à resistência da infecção pelo VIH e a progressão para a SIDA de alguns grupos de indivíduos. Este fenômeno é bastante incomum, contudo é de

suma importância o seu estudo, na tentativa de se desenvolver novas soluções para controle e prevenção da infecção. Até o presente, para a grande maioria dos indivíduos infectados, a terapia antiretroviral é a única alternativa efetiva para o controle da patologia.

### 1.2.2 Sarcoma de Kaposi

O Sarcoma de Kaposi (KS) é a mais comum das manifestações da infecção pelo VIH. (GILL; et al, 1997. CDC, 1993. HOOVER et al, 1993) O tumor afeta cerca de 20-30% dos homossexuais masculinos e cerca de 1-3% de indivíduos de outros grupos de risco com SIDA, podendo ser observado em indivíduos soronegativos para o VIH. (GILL; et al, 1997. LEVINE, 1997)

A causa do tumor foi recentemente identificada, sendo encontrado um herpesvírus associado às lesões do KS (KSHV-herpes vírus associado ao KS). (MORSE; et al, 1996. NATIONAL CANCER INSTITUTE AND HEALTHCARE COMMUNICATIONS GROUP, 1997) Alguns estudos evidenciam a correlação entre o diagnóstico do Sarcoma de Kaposi à presença de infecção com Herpes vírus humano tipo-8 (HHV8/KSHV). (LEVINE, 1997. NATIONAL CANCER INSTITUTE AND HEALTHCARE COMMUNICATIONS GROUP, 1997. MORSE; et al, 1996) Este vírus foi detectado em tecidos com KS por Chang e Moore utilizando diversas análises para determinar a sequência de DNA nos tecidos afetados pelo tumor, onde se observou-se o vírus em 90% dos casos de sarcoma.

Um dos fatores que parecem levar a uma predisposição e ao progresso no desenvolvimento de KS em pacientes com SIDA é a baixa contagem de CD4 ( $CD4 < 200 \text{ cel/mm}^3$ ), história de linfoma das células "B" e a presença de outras doenças relacionadas a SIDA. Evidências epidemiológicas sugerem a possibilidade de um cofator na transmissão sexual podendo ser relacionado a via de recepção anal. (LEVINE, 1997) A imunossupressão parece ser um fator contribuidor para o aparecimento do tumor, sendo este também observado em pacientes com órgãos transplantados fazendo uso de drogas imunossupressivas, com a retirada dos medicamentos ocorre um retorno espontâneo do KS em 20-30% dos casos, outro fator pode estar relacionado a uma predisposição genética. (LEVINE, 1997)

A incidência do KS em pacientes com SIDA parece declinar, isto possivelmente devido a terapia antiretroviral, ocorrendo também casos de não progressão ou regressão espontânea quando relatado durante a gestação. (ALBINI; et al, 1997)

O KS apresenta-se como pápulas ou nódulos roxo-avermelhados (MORSE; et al, 1996), é caracterizado por lesões altamente vascularizadas, mesenquimal com células espiraladas malignas. (ALBINI; et al, 1997) A malignidade é altamente agressiva e disseminada podendo aparecer cutaneamente, em mucosas (como lesões mucocutâneas e pigmentadas), linfadenopatia, podendo também haver envolvimento visceral. (ABBAS et al, 1994. ALBINI; et al, 1997)

## DISCUSSÃO

São inúmeras as tentativas no nível da pesquisa que objetivam a melhoria de vida de acometidos de SIDA. Em 1995, uma equipe de pesquisa americana, do Instituto de Virologia Humana em Baltimore (EUA), chefiada pelos doutores Gallo e Lunardi-Iskandar, encarregada de estudar sarcoma de Kaposi induzido transgenicamente em uma linhagem de camundongos desde 1993, obtiveram um resultado interessante: ao colocar, acidentalmente, 2 machos e 4 fêmeas em uma mesma gaiola, Joseph Bryant, um dos pesquisadores da equipe, notou que houve emprenhamento das 4 fêmeas que se mostravam resistentes ao desenvolvimento do KS que de outra forma se manifestaria em todos os indivíduos não grávidos, o que aconteceu nos machos. Este achado incentivou a equipe a procurar uma justificativa lógica para o acontecimento. Certamente que procurou-se imediatamente focar nas diferenças ocorrentes em gestantes e o resto da população.

Uma das diferenças mais evidentes entre estes grupos em humanos é a quantidade de gonadotrofina coriônica circulante. A partir desta assertiva, testou-se a capacidade de soros e urinas concentradas provenientes de gestantes humanas de primeiro trimestre (onde as concentrações do hormônio são mais elevadas) em inibir o desenvolvimento *in vitro* de linhagens celulares experimentais de KS. Os resultados mostraram-se promissores, o que fez desenvolver a idéia de que poderia haver alguma substância nestes materiais (principalmente urina) que pudesse estar ligada à inibição do KS. Tal substância, por ser desconhecida, foi empiricamente batizada HAF-*HCG Associated Factor* (Fator Associado ao hCG). (LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995. ALBINI et al, 1997. BRAUNSTEIN; et al, 1979) Isto foi reforçado, ao se utilizar a informação de que mulheres grávidas com SIDA apresentavam uma “resolução espontânea” de KS. (GOLD, 1994)

Com base nestes achados, e no conhecimento de que as preparações comerciais de hCG são produzidas a partir de concentração e purificação de urinas de gestantes de primeiro trimestre, vários autores testaram o uso destes preparados nas linhagens transgênicas de KS *in vivo*. LUNARDI-ISKANDAR e colaboradores mostraram em 1995 que linhagens celulares de KS imortalizadas ou não (KS Y-1, associada ao VIH, e KS SLK, não associada ao VIH, e linhagens obtidas de amostras clínicas) eram neutralizadas *in vitro* por preparações de hCG, aparentemente por apoptose, indução programada de morte celular. Como controle, foi submetido o mesmo protocolo a linhagens de células endoteliais normais, que nada sofreram. (LUNARDI-ISKANDAR; et al, 1995)

Devido à grande variação entre a atividade de diferentes preparados comerciais, e mesmo entre preparados de mesma procedência com diferença lote a lote, quatro preparados de diferentes procedências foram testados para sua atividade anti-KS *in vitro*. O mais ativo dos quatro, contra as linhagens celulares estudadas, segundo os estudos, foi o preparado da Wyeth-Ayerst Labs, o que chamou atenção para a possibilidade de não ser somente o HCG, ou mesmo nem ser o hormônio o responsável por estes efeitos.. (JAMES, 1996. GILL; et al, 1996)

A partir disto, foi testada a capacidade de vários preparados de suprimir o desenvolvimento de KS *in vivo*. Inicialmente estudou-se uma linhagem transgênica de camundongos capaz de desenvolver KS. Esta linhagem foi geneticamente manipulada para conter genes incompletos do VIH em suas células- assim,

o vírus não se reproduz, mas algumas proteínas virais são produzidas, o que faz com que haja o desenvolvimento de sintomas característicos da doença, como as lesões dérmicas típicas do KS, emagrecimento e morte em 3 a 6 semanas.

Os animais desta linhagem tratados com hCG apresentaram desenvolvimento em peso próximo ao normal e resistência ao desenvolvimento de KS, de maneira dose-dependente. Além do mais, suas células produziam quantidades consideravelmente menores de proteína viral, que os controles (SWAPAN; et al, 1997).

Em Outubro de 1996, no *New England Journal of Medicine*, GILL e colaboradores publicaram o resultado de uma pesquisa envolvendo preparados de hCG utilizados em voluntários humanos. Os resultados deixaram poucas dúvidas quanto à importância de padronização do novo tratamento proposto, bastante diferente da quimioterapia convencional.

Posteriormente, um teste de variação de dose foi empregado utilizando quatro diferentes doses (250, 500, 1000 e 2000UI, injetadas topicamente, de modo subcutâneo na lesão). As doses foram administradas três vezes por semana por duas semanas. Havia seis pacientes em cada grupo de dose, e duas lesões foram injetadas por cada paciente (uma terceira lesão era injetada com diluente, como controle). Houve uma resposta completa em doze, no grupo de menor dose; uma resposta completa e duas parciais com 500UI; uma resposta completa e quatro parciais com 1000UI, e dez respostas com 2000UI, cinco das quais negativas para KS, por biópsia.

Em 1998, LUNARDI-ISKANDAR e colaboradores testaram diferentes preparados de hCG em relação à suas atividades anti-KS, anti-VIH, anti-SIV e pró-hematopoiética *in vivo* e *in vitro*. Encontraram atividades variadas conforme os preparados, mas a atividade, segundo os autores, não era relacionada diretamente a moléculas hCG associadas, e sim a um provável contaminante do processo industrial, que, após separação cromatográfica poderia ser uma estrutura de 15-30 kD ou 2-4 kD.

HARRIS em 1996, demonstrou que o hCG possui uma atividade antiviral de amplo espectro. A capacidade antiviral do hCG já havia sido testada anteriormente *in vitro*, com um protocolo que testava a transmissão do VIH-1 de linfócitos a trofoblastos. Esta transmissão se mostrou diminuída, o que levou à conclusão de que o hormônio poderia ser auxiliar na conferência de proteção intrauterina ao vírus. Além disto, o hCG e outros hormônios foram utilizados para testar uma eventual inibição de síntese do VIH-1 em linfócitos e monócitos, e verificou-se que esta inibição só ocorria a nível monocitário. (BOURINBAIAR e NAGORY, 1992) Estes achados, e outros de que o hCG inibia a transcriptase reversa tanto em linfócitos como em monócitos, e de que há realmente o bloqueio da transmissão célula-célula por parte do vírus levou à procura mais objetiva da real natureza do agente associado aos efeitos. BOURINBAIAR e colaboradores em 1996, testando a produção de p24 por células infectadas *in vitro* em contato com frações purificadas de alfa e beta hCG percebeu que há efeito com o uso de beta hCG, ao contrário da alfa-hCG.

Continuando, em 1997 BOURINBAIAR e sua equipe utilizaram uma análise de fragmentação da molécula do hCG para determinar o sítio ativo. Em primeiro lugar, descobriram que as porções terminais amínicas e carbóxi possuíam atividade, e que a atividade mais proeminente se deu com o uso dos resíduos de aminoácidos 106-145 da porção carbóxi-terminal da molécula, própria ao hCG, que se comportava de maneira similar aos estudos anteriores.

Em contraste com os achados promissores, TAVIO e colaboradores, em 1998, publicaram resultados de um estudo clínico em que havia dois grupos tratados com doses baixas (4000 – 32000 UI) e altas (100000 – 300000 UI), administradas intramuscularmente por 4 meses em pacientes com SIDA. Os resultados foram pouco promissores, com baixos níveis de redução clínica de KS e ausência de efeito sobre a carga viral. Isto pode ser devido ao fato de se estar utilizando um preparado pobre em HAF, no caso de o fator em questão ser dissociado do hCG, ou mesmo de o protocolo utilizado ser pouco efetivo (por exemplo, na opção de uso sistêmico, embora esta via tenha sido utilizada com sucesso por outros). Os mesmos resultados reservados foram obtidos por Witzke e colaboradores em 1997, que, adicionalmente, relatou a ausência de sérios efeitos colaterais do uso do hormônio; concluindo que o uso do hCG é seguro, porém não efetivo contra KS ou replicação viral. ALBINI e colaboradores, em 1997, realizaram testes *in vitro* com subunidade beta, hCG recombinante, e urinário. A fração beta, neste estudo, foi a que mais apresentou atividade anti-KS. Desta forma, os dados sugeriram que a atividade do hCG nas células de KS foi mais provável na fração beta-core do hCG, ao contrário dos resultados de BOURINBAIAR e colaboradores em 1997. (ALBINI et al, 1997. BOURINBAIAR; et al, 1997)

Gallo e colaboradores acreditam na presença de um fator associado ao hCG ainda não identificado. ALBINI e colaboradores em 1997 apostam na atividade do fragmento beta-core do hCG. BOURINBAIAR e colaboradores em 1997 encontraram atividade em um resíduo específico da subunidade beta, como acima descrito. GRIFFITHS e colaboradores em 1997 encontraram atividade em um contaminante dos preparados comerciais com atividade de RNase. Os mesmos especulam uma possível atividade sinérgica entre o beta-core e a RNase, culminando com a atividade anti-KS e anti-VIH-1. De todo modo, é certo que preparados comerciais possuem menos de 40% de pureza, o que dificulta a tomada de conclusões.

KACHRA e colaboradores em 1997 demonstraram que a atividade hCG e atividades anti-KS, anti-VIH e pró-hematopoiéticas são independentes. Tentativas clínicas têm sido realizadas, mesmo sem a padronização do protocolo, como o caso descrito por Gold, em 1994, onde um paciente com SIDA iniciou um tratamento com 5000 UI intramuscular 3 vezes por semana, com melhora clínica e ausência de efeitos colaterais relatados. (GOLD, 1994)

Note-se que, se o HAF é realmente distinto da hCG, e aparece nos preparados comerciais apenas como contaminante, então, após a identificação e estabelecimento da estrutura química desta molécula, poderão se fazer preparados farmacêuticos muito potentes no combate à SIDA e outros tipos de câncer. (HIGHLEYMAN, 1998)

Uma vez que camundongos não possuem hCG, e frente aos diferentes resultados obtidos pelos pesquisadores com preparados de hCG, é prudente pensar que: (a) ou a molécula HAF não é de fato relacionada ao hCG, ou (b) a molécula é relacionada ao hCG mas não é o próprio, e sim o resultado de uma modificação molecular por fracionamento ou outra via catabólica (LUNARDI-ISKANDAR et al, 1998).

## CONCLUSÃO

Os achados sumarizados neste trabalho dão conta de que existe grande possibilidade de haver um fator associado à gravidez capaz de propiciar melhora clínica em relação a alguns quadros decorrentes da SIDA. A princípio, acreditou-se que este fator seria o próprio hCG ou um metabólito/subunidade, contudo, alguns autores põem esta afirmação sob suspeita, acreditando que este fator seja um contaminante do processo de purificação industrial do preparado farmacêutico do hCG. Diferentes trabalhos obtiveram diferentes resultados, ora comprovando ser este fator associado ao hCG, ora o contrário. Sabe-se no entanto, que, seja qual for a natureza deste fator, este é associado a situações gestacionais, do que propriamente associado ao hCG.

Mesmo havendo sérias discordâncias em relação à caracterização química deste fator, é naturalmente perceptível a importância do estudo mais aprofundado do tema, posto que suas aplicações podem ser de inestimável valor para o combate à doença. Em primeiro lugar, podendo-se compreender melhor e tentar utilizar os mecanismos pelos quais apenas uma minoria de crianças providas de gestantes soropositivas contaminam-se com o vírus. Ainda, poderia-se esclarecer mais sobre resistências naturais ao vírus ou ao desenvolvimento da doença, o que teria evidente impacto sobre a pandemia da SIDA. Mais possivelmente, seu uso poderia, em curto ou médio prazo, propiciar melhoria na qualidade de vida de portadores do vírus por diminuir a incidência e gravidade de KS e da síndrome da inanição associada à SIDA.

Acreditamos que em breve, o segredo químico deste fator será elucidado, e novos trabalhos e muitas soluções possam ser derivados desta nova vertente no estudo das infecções causadas por VIH. O apontamento de uma entidade bioquímica única ou grupo de entidades bioquímicas poderá proporcionar a padronização de protocolos de testagem clínica para atividades anti-KS e atividades antivirais, entre outras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Celular and Molecular Immunology*. 2ª ed. W. B. Saunders. p. 418-429, 1994.
2. AIDS treatment uptake. Mother-to-baby transmission. Factsheet. v. 15, p. 1-3, Jun. 1997.
3. AIDS AS. Update on HIV and the Health-Care Worker. Natural Resistance to HIV/AIDS. <http://niv.ac.za/virusa/aid63.htm>. v. 6, nº 3. Massachusetts: 1998.
4. ALBINI, A.; et al. The  $\mathcal{Q}$ -fragment of human chorionic gonadotrophin inhibits growth of kaposi sarcoma- derived cells and a new immortalized kaposi sarcoma cell line. AIDS. v. 11, nº 6, p. 713-721, 1997.
5. ALEXANDER, H.; ZIMMERMANN G.; LEHMANN M.; et al. HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy. Domestic Animals Endocrinology v.15, nº 5, p. 377-387, Sep.1998.
6. ANDIMAN, W. Medical management of the pregnant woman infect with human immunodeficiency vírus type-1 and her child. Seminars in Perinatology. v. 22, nº 1, p. 72-86, 1998.

7. BASSET E.W.; REISS, A. M. Immunochemical studies on human chorionic gonadotropin (HCG).I. Characterization of HCG. International Archives of Applied Immunology. v. 40, nº 6, p. 881-897, 1971.
8. BLANCHE, S.B.; ROUZIQUX, C.; et al. A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type-1. The New England Journal of Medicine. nº 320, p. 1643-1648, 1989.
9. BOARD, S. Unethical trials of interventions to reduce perinatal transmission of the human immunodeficiency virus in developing countries. The New England Journal of Medicine. v. 337, nº 12, p. 853-856, 1997.
10. BOURINBAIAR, A.S.; LEE-HUANG, S. Anti-HIV effect of beta subunit of chorionic gonadotropin ( $\beta$ -HCG) in vitro. Immunology Letters. nº 44, p. 13-18, 1995.
11. \_\_\_\_\_, A.S.; et al. The role of Carboxi-Terminal portion of beta subunit of human immunodeficiency virus infection. Life Sciences. v. 61, nº 11, p. 149-157, 1997.
12. \_\_\_\_\_, A.S.; NAGORY, R. Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on reverse transcriptase activity in HIV-1 infected lymphocytes and monocytes. FEMS microbiol Lett. v. 75, nº 1, p. 27-30, 1992.
13. \_\_\_\_\_, A.S.; NAGORY, R. Inhibitory effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on HIV-1 transmission from lymphocytes to trophoblasts. FEBS Lett. nº 309, p. 82-84, 1992.
14. BOWER, M.; FIFE K.; NELSON, M.; YOULE, M. Human chorionic gonadotropin for AIDS-related Kaposi's sarcoma [letter; comment]. Lancet. v. 2, nº 346, Sep. 1995.
15. BRAUSTEIN G.D.; KAMDAR V.; RASOR J.; et al. Widespread distribution of a chorionic gonadotropin-like substance in normal human tissues. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. v. 49, nº 6, p. 917-925, Dec. 1979.
16. BREDGBERG-RADEN, U.; et al. Predictive markers for mother-to-child transmission of HIV-1 in Dar es Salaam. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. Tanzania: v. 8, p. 182-187, 1995.
17. BROCKLEHURST, P. Interventions aimed at decreasing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. HIV infection in pregnancy. The Cochrane Library. 1997.
18. BURGARD, M.; MAYAUX, M.J.; BLANCHES, S.; et al. The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. The New England Journal of Medicine. v. 327, p. 1192-1197, 1992.
19. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2ª ed. Saunders. 1986.
20. CAMPOS, J.M.S. Redução da Transmissão Vertical do HIV através do uso do AZT na gestação. FEMINA. v. 23, nº 2, p. 190, 1995.
21. CARMICHAEL, C. Preventing perinatal transmission: Zidovudine use during pregnancy. American Family Physician. v. 55, nº 1, 1997.
22. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. HIV/AIDS Surveillance Report. p. 1-23, Feb. 1993.
23. CLERCQ, E. Antiviral therapy for HUMAN immunodeficiency Virus infection. Clinical Microbiology Reviews. p. 200-239, 1995.
24. COLE, L.A.; KARDANA, A.; ANDRADE-GORDON, P.; et al. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (HCG) III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked (HCG). Endocrinology. v. 129, nº 3, p. 1559-1567, Sep. 1991.

25. CRAVEN, D.E.; et al. Human Immunodeficiency Virus infection in pregnancy: Epidemiology and Prevention of Vertical Transmission. Infected Control Hospital Epidemiol. n° 15, p. 36-47, 1994.
26. DE MEDEIROS, S.F.; AMATO F.; BACICH D.; et al. Distribution of the beta-core human chorionic gonadotrophin fragment in human body fluids. Journal Endocrinology. v. 135, n° 1, p. 175-188, Oct. 1992.
27. DOI F.; CHI, D.D.; CHARUWORN, B.B.; et al. Detection of beta-human chorionic gonadotropin mrna as a marker for cutaneous malignant melanoma. Int. J. Cancer. v. 65, n° 4, p. 454-459, Fev. 8<sup>th</sup>, 1996.
28. FEDRIZZI, E.N. AIDS na mulher. Femina. p. 614-616, jul. 1992.
29. FLEXNER, C. HIV-Protease Inhibitors Drug Therapy. The New England Journal of Medicine. v. 338, n° 18, 1998.
30. GILL, P.S.; LUNARDI-ISHKANDAR, Y.; LOUIE, S.; et al. The effects of preparations of human chorionic gonadotropin on AIDS-related Kaposi's sarcoma. The New England Journal of Medicine. v. 335, n° 17, p. 1261-1269, Oct. 24<sup>th</sup>, 1996.
31. \_\_\_\_\_, P.S.; LUNARDI-ISKANDAR, Y.; LOUIE, S.; et al. Phase I of Human Chorionic Gonadotropin Given Subcutaneously to Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome Related Mucocutaneous Kaposi's Sarcoma. Journal of the National Cancer Institute. v. 89, n° 23, p. 1797-1802, Dec. 1997.
32. \_\_\_\_\_, P.S.; LUNARDI-ISHKANDAR, Y.; LOUIE, S.; et al. The effects of preparations of human chorionic gonadotropin on AIDS-related Kaposi's sarcoma. The New England Journal of Medicine. 335:17 1261-9, Oct. 24<sup>th</sup>, 1996.
33. GILMAN A.G.; RALL T.W.; NIES A.S.; et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
34. GOLD, D. Pregnancy Hormone Studied for KS. Treatment Issues. v. 8, n° 7, Aug. 1994.
35. GOLDSMITH, P.C.; MCGREGOR, W.G.; RAYMOURE, W.J.; et al. Cellular localization of chorionic gonadotropin in human fetal kidney and liver. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. v. 57, n° 3, p. 654-661, Sep. 1983.
36. GRIFFITHS, S.J.; ADAMS, T.J.; TALBOT, J.F. Ribonuclease inhibits Kaposi's sarcoma. Nature. p. 390:568, 1997.
37. HARRIS, P.J. Human Chorionic gonadotropin hormone is antiviral. J. Med. Hypotheses. v. 47, p. 71-72, 1996.
38. HIGHLEYMAN, L. Drug Watch: Human Chorionic Gonadotropin-Associated Factor. BETA- Bulletin of Experimental Treatment for AIDS. July 1998.
39. HOOVER, D.R.; BLACK C.; JACOBSEN, L.P.; et al. Epidemiologic analysis of Kaposi's sarcoma as an early and later AIDS outcome in homosexual men. American Journal Epidemiology. v. 138, p. 266-278, 1993.
40. HUHTANIEMI, I.T.; KORENBROT, C.C.; JAFFE, R.B. Content of chorionic gonadotropin in human fetal tissues. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. v. 46, n° 6, p. 994-997, Jun. 1978.
41. INFOC. Programa de Atualização Científica. a. 1, n° 10, 1996.

42. JACQUES, J.A. Mother-to-child transmission of HIV-1. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology. nº 16, p. 184-192, 1997.
43. KACHRA, Z.; GUO, W.X.; SAIRAM, M.R.; et al. Low molecular weight components but not dimeric HCG inhibit growth and down-regulate AP-1 transcription factor in Kaposi's sarcoma cells. Endocrinology. v.138, nº 9, p. 4038-4041, Sep. 1997.
44. KRIVINE, A.; FIRTION, G.; CAO, L.; et al. HIV replication during the first weeks of life. Lancet. v. 339, p. 1187-1189, 1992
45. LEVINE, A. 7<sup>th</sup> Clinical Options in HIV Symposium HIV Related Cancers: Emerging Trends and Management Issue. Medscape HIV/AIDS. v. 3, nº 2, 1997.
46. LIN, J.; LOJUN, S.; LEI, Z.M.; et al. Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. Molecular Cellular Endocrinology. v. 111, p. 13-17, 1995.
47. LUNARDI-ISKANDAR, Y.; BRYANT, J.; et al. Effects of a urinary factor from women in early pregnancy on HIV-1, SIV and associated disease. Nature Medicine. v. 4, nº 4, p. 428-434, 1998.
48. \_\_\_\_\_, Y.; GILL, P.; LAM, V.H.; et al. Isolation and characterization of an immortal neoplastic cell line (KS Y-1) from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Journal of the National Cancer Institute. v. 87, nº 13, p. 974-981, Jul. 5<sup>th</sup>, 1995.
49. \_\_\_\_\_, Y.; BRYANT, J.L.; ZEMAN, R.A.; et al. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. Nature. v. 375, nº 6526, p. 64-68, May 4<sup>th</sup>, 1995.
50. MADAULE, P.; AXEL, R. A novel ras-related gene family. Cell. v. 41, nº 1, p. 31-40, May 1985.
51. MAIA, N.L.F. AIDS e gravidez. Go Atual. nº 5, p. 62-66, 1997.
52. \_\_\_\_\_, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Principles and Practice of Infectious Disease. Churchill Livingstone. 4<sup>a</sup> ed., New York: 1995.
53. MAYAUX, M-J.; et al. Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: The french cohort study: 7 years of follow-up observation. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology. nº 8, p. 188-194, 1995.
54. MORSE, S.A.; MORELAND, A.A; HOLMES, K.K. Atlas de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Artes Médicas. p. 166-205, 1996.
55. NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) AND HEALTHCARE COMMUNICATIONS GROUP (HCG). National AIDS Malignancy Conference will be co-produced by NCI and HCG. Apr, 1997.
56. PABON, J.E.; BIRD, J.S.; LI, X.; HUANG, Z.H.; et al. Human skin contains luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. v. 81, nº 7, p. 2738-2741, Jul. 1996.
57. PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. Química clínica: Métodos. Panamericana, Buenos Aires, São Paulo: 1991.
58. POLICASTRO, P.; OVITTI, C.E.; HOSHINA, M.; et al. The beta subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. Journal Biological Chemistry. v. 258, p. 11492-11499, 1983.
59. REICHERT JR, L.E.; DATTATREYAMURTY, B.; et al. Trends Pharmacol. Science. nº 12. p. 199, 1991.

60. REINISCH, N.; SITTE, B.A.; et al. J. Endocrinol. v. 142, p. 167-170, 1994.
61. ROUZIOUX, C; COSTAGLIOLA, D.; BURGARD, M.; et al. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission depends on maternal status. AIDS, n° 7, p. 49-52, 1993.
62. RUSSO, I.H.; KOSZALKA, M.; RUSSO, J. Human chorionic gonadotropin and rat mammary cancer prevention. Journal of the National Cancer Institute. v. 82, n° 15, p. 1286-1289, Aug. 1<sup>st</sup>, 1990.
63. SCARLATTI, G.; et al. Transmission of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. Virology. n° 197, p. 624-629, 1993.
64. SEGALOFF, D.L.; et al. Rec. Prog. Hormone Res. n° 46, p. 261, 1996.
65. SIMONON, A.; LEPAGE, P.; KARITA, E.; et al. An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction. Journal Acquired Immune Deficiency Syndrome, v. 7, p. 952-957, 1994.
66. ST. LOUIS, M.E.; et al. Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic and placental factors. JAMA. n° 269, p. 2853-2859, 1993.
67. SULLIVAN, J.; et al. Human Maternal viral load, CD4 counts are factors in perinatal HIV transmission. Infectious diseases in children. 1997.
68. SWAPAN, K. D.; et al. Human Chorionic Gonadotrophin Hormone Prevents Wasting Syndrome and death in HIV-1 transgenic Mice. Journal of Clinical Invest. v. 99, n° 7, p. 1484-1491, 1997.
69. TAVIO, M.; RASI, S.; SIMONELLI, C.; et al. Human chorionic gonadotropin in the treatment of HIV-related Kaposi's sarcoma. European Journal of Cancer. v. 34, n° 10, p. 1634-1637, Sep. 1998.
70. TIETZ, N.W. Comparative study of immunologic and biologic pregnancy tests in early pregnancy. Obstetrician and Gynecology, v. 2, p. 197-200, 1965.
71. VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia Clinica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998.
72. WALLACH, JB. Interpretation of Diagnostic Tests. Little Brown. Boston: 1996.
73. WENTZ, A. H. Maternal viral load, CD4 counts are factors in perinatal HIV transmission. Infectioun Disease in Children, 1997.
74. WITZKE, O.; HENSE, J.; REINHARDT, W.; et al. Beta-Human choriogonadotrpin therapy and HIV-related Kaposi's sarcoma. European Journal of Medical Research, v. 2, n° 4, p.155-158, Apr. 21<sup>st</sup>.
75. ZICIK, A.J.; DERECKA-RESZKA, K.; RZUCIDO, S.J. Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. Journal Physiol. Pharmacol, v. 43, n° 4, Suppl. 1, p. 33-49, Dec. 1992.

# **OS SUPERANTÍGENOS E AS DOENÇAS HUMANAS**

## **THE SUPERANTIGENS AND THE HUMAN DISEASES \***

**Melissa Siviero<sup>1</sup> & Shirley Rosa Utiyama<sup>2</sup>**

1- Farmacêutica Bioquímica do Laboratório da Paraná Clínicas, Curitiba, Pr.

2- Professora do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr.

\* Trabalho derivado da Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista ao Curso de Pós Graduação em Microbiologia Clínica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

**Autor para correspondência:**

**Prof. Shirley Ramos da Rosa Utiyama**  
**Laboratório de Imunopatologia**  
**Departamento de Patologia Médica**  
**Setor de Ciências da Saúde-UFPR**  
**Rua Padre Camargo, 280**  
**80069-900 - Curitiba - Pr**  
**FAX: 041-2644191**

**RESUMO**

Superantígenos são proteínas que exercem um potente efeito no sistema imune. Como moléculas bifuncionais, eles permitem uma interação entre as moléculas MHC de classe II das células apresentadoras de antígeno e a região V $\beta$  do receptor TCR de linfócitos, levando a uma intensa ativação destas células. Tal ativação pode ter diferentes consequências, como proliferação, deleção ou indução de anergia celular. Os superantígenos podem ser expressos por uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, vírus e algumas espécies de micoplasmas. Os superantígenos bacterianos mais bem caracterizados são as exotoxinas pirogênicas produzidas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, as quais estão envolvidas em muitas doenças, tais como a síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar, síndrome de Kawasaki e síndrome da pele escaldada estafilocócica. O tratamento dessas patologias pode ser feito com o uso de antibióticos, quando o diagnóstico for precoce. Em estágios mais avançados, tratamentos direcionados em bloquear o sistema imune são mais recomendados. Aplicações terapêuticas para as moléculas de superantígenos no tratamento do câncer e doenças infecciosas tem sido investigadas.

**Palavras chave:** Superantígenos, linfocinas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

## ABSTRACT

Superantigens are proteins which have a potent effect on the immune system. As bifunctional molecules, they permit an interaction between MHC class II molecules of the antigen-presenting cells and the V $\beta$  domains of T cell receptors, leading to a massive stimulation of T cells. This stimulation induces different consequences, such as proliferation, deletion or T cell anergy. Superantigens can be produced by several microorganisms like bacteria, virus and certain mycoplasma species. The prototype bacterial superantigens are the pyrogenic exotoxins produced by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, and they are potentially involved in a variety of human diseases, such as toxic shock syndrome, food poisoning, Kawasaki disease and staphylococcal scalded skin syndrome. In most cases of those diseases, early diagnosis lead to a successful treatment with appropriate antibiotics, however in advanced stages, therapies directed towards blocking the immune response are more appropriate. Therapeutic applications for superantigens molecules in the cancer therapy and infectious diseases have been investigated.

**Key words:** Superantigens, lymphokines, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

## INTRODUÇÃO

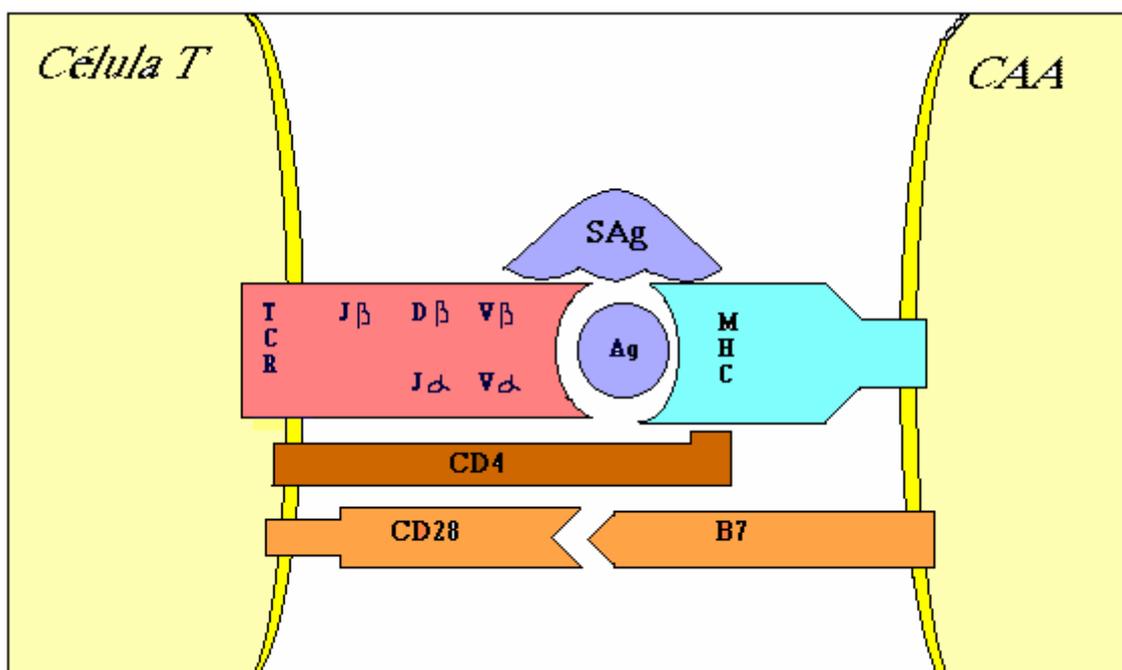
Os superantígenos representam na área científica um tema recente, que passou a chamar a atenção de muitos pesquisadores. A maneira

como atuam sobre o sistema imune e as consequências dessa ação tornaram-se muito importantes, tanto no esclarecimento da etiologia de inúmeras doenças, como no tratamento das mesmas.

Superantígeno é a designação dada para um grupo heterogêneo de proteínas, que usam um incomum e eficaz mecanismo de estimulação do sistema imune. Essas são consideradas moléculas bifuncionais que levam a uma ativação policlonal de células T através da associação direta entre a molécula MHC de classe II na superfície da célula apresentadora de antígeno (CAA), e a cadeia  $V\beta$  específica do receptor de antígeno na célula T (TCR), resultando em uma ativação policlonal de células T. Esta propriedade conferiu a essas moléculas a designação de “super antígenos” devido a proporção da resposta imune ser muito maior que aquela induzida por um antígeno convencional (19).

O mecanismo pelo qual os superantígenos estimulam as células T é diferente dos antígenos convencionais. Antígenos convencionais são processados pelas CAAs em peptídeos que combinam-se com a molécula MHC classe II para apresentação a células T. Em contraste, os superantígenos não necessitam ser processados pela CAA para combinar com a molécula MHC classe II e ser apresentado a célula T, ligando-se em sítios distintos do qual um antígeno normal se liga (figura 1). Ele interage com a região variável da cadeia  $\beta$  da molécula TCR. Esta habilidade de interagir com elementos específicos de  $V\beta$  não leva em consideração a especificidade a antígeno. Dependendo do tipo de interação, o reconhecimento de um superantígeno pela célula T pode ter diferentes consequências, incluindo proliferação, supressão (deleção), ou alternativamente uma indução de anergia ou morte celular (apoptose) (2).

**Figura 1- Interação entre superantígeno, TCR e molécula MHC de classe II**



Devido a esta simplificação no processo, segundo Kotzin, 1994 (9), os superantígenos podem interagir com 5 a 30% das células T, em comparação com um antígeno convencional que evoca uma resposta menor que 0,01% de todo o repertório de células T do indivíduo.

Os superantígenos podem ser expressos por uma grande variedade de microorganismos como bactérias, vírus e algumas espécies de micoplasmas.

Os superantígenos bacterianos mais bem caracterizados são as enterotoxinas estafilocócicas de A a E, a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico e a Toxina Esfoliativa. Todas estas toxinas são liberadas pelo *Staphylococcus aureus*. Outras proteínas bacterianas com propriedades de superantígenos são as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas de A a C, uma proteína da *Yersinia pseudotuberculosis* e do *Mycoplasma arthritidis*. Proteínas virais com ação de superantígenos também tem sido demonstradas (19, 26).

## MECANISMO DE ESTIMULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

A interação dos superantígenos com moléculas de classe II é importante para sua habilidade em estimular as células T. Nas células acessórias que não expressam classe II faltam coestimuladores para resposta ao superantígeno (18).

Os superantígenos dependem da expressão de classe II, não porque eles podem ser vistos somente no contexto destas moléculas, mas porque eles utilizam a molécula MHC de classe II como receptor de sinais, os quais podem induzir a CAA a expressar moléculas coestimuladoras requeridas para a ativação da célula T (11).

Os superantígenos não se ligam na região mais polimórfica como antígenos convencionais, mas associados em regiões mais conservadas na lateral externa da molécula (figura 1). Os superantígenos não podem ser apresentados pelas moléculas de classe I. A ligação de um superantígeno a TCR não exclui a ligação a um antígeno convencional porque eles interagem em sítios distintos no receptor. A interação de superantígenos com a célula T é governado primeiramente por elementos V $\beta$  com pequena contribuição de outros elementos variáveis da TCR. Em humanos, os elementos V $\beta$  são agrupados em 25 famílias maiores com base em sua sequência. Cada superantígeno tem uma especificidade para um conjunto de famílias V $\beta$  e pode interagir com todas as células T que expressarem estes elementos V $\beta$ , indiferente da especificidade antigênica de TCR (7, 10, 17, 30).

Individualmente quem tiver maior frequência na expressão de determinadas células T e elementos V $\beta$  pode reconhecer um superantígeno em particular e terá mais facilidade de desenvolver fortes respostas a este superantígeno do que os indivíduos que tiverem baixa frequência destas células T em seu repertório. Similarmente, indivíduos que expressem moléculas distintas de classe II, com diferentes ligações afins ao superantígeno, podem diferir em sua resposta a um superantígeno em particular e conseqüentemente variar os sintomas clínicos conforme exposição *in vivo* a este superantígeno (10).

A interação entre superantígeno e células T nem sempre leva a ativação, proliferação e expansão de células que expressam apropriados elementos V $\beta$ . A ativação das células T requer dois sinais: um de liberação da molécula TCR comprometida e outro de interação da CAA associada com moléculas coestimuladoras com respectivos ligantes na célula T. Através da sua habilidade de ligar as células T e a CAA, os superantígenos podem trazer moléculas coestimuladoras como a B7 e a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) mais próximo aos seus respectivos ligantes, CD28 e molécula funcional associada a linfócitos-1 (LFA-1). Este fato permite uma melhor interação e mais eficiente tradução dos sinais requeridos no programa de ativação e proliferação das células T. Na ausência de sinais coestimulatórios, o engajamento da TCR pelo superantígeno induz células T anérgicas. Contrariamente, na presença de níveis elevados de citocinas, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou gama interferon (IFN- $\gamma$ ), um reengajamento da molécula TCR pelo superantígeno em células T pré-ativadas podem levar a um processo de morte celular programada (apoptose) o qual pode ser seguido por deleção seletiva de células T -superantígeno específicas (8, 18, 21, 30, 31).

## ESPECIFICIDADES V $\beta$

Para analisar o repertório V $\beta$  de um indivíduo em contato com um superantígeno e determinar qual família V $\beta$  se prolifera preferencialmente, três métodos são usados. O método de citometria de fluxo que utiliza anticorpos monoclonais V $\beta$  específicos de ratos. Este método é limitado devido a falta de validade destes anticorpos para todas as famílias de V $\beta$  humanas. O segundo método é uma técnica de PCR, o qual pareia um primer 5' V $\beta$  família específica com um primer 3'C $\beta$  para amplificar as famílias específicas cDNA. Quando feito adequadamente, este método produz alta reprodutibilidade, resultando na análise de todo o repertório V $\beta$ . Entretanto, o melhor método para análise do repertório de TCR é o método riboprobe, que é um método de proteção a RNase. É recomendado que quando possível, mais de um método seja usado para confirmar a especificidade V $\beta$  de um superantígeno em particular. (1, 6, 12).

A tabela 1 relaciona alguns superantígenos com a sua especificidade a TCR V $\beta$  (10).

**TABELA 1 – SUPERANTÍGENOS E ESPECIFICIDADES V $\beta$**

<b>Exotoxinas Pirogênicas</b>	<b>Especificidade V<math>\beta</math></b>
Exotoxinas Estafilocócicas	
SEA	1, 5, 6, 7, 9
SEB	3, 12, 14, 15, 17, 20
SEC1	3, 6, 12, 15
SEC2	12, 13.2, 14, 15, 17, 20
SEC3	3, 5, 12, 13.2
SED	5, 12
SEE	5.1, 6, 8, 18
TSST1	2

EXF-T	2
Exotoxinas Estreptocócicas	
SpeA	2, 12, 14, 15
SpeB	8
SpeC	1, 2, 5.1, 10
SPeF (MF)	2, 4, 8, 15, 19
SSA	1, 3, 5.2, 15

**SE:** Exotoxina estafilocócica; **TSST-1:** Toxina 1 da síndrome do choque tóxico; **EXF-T:** Toxina exfoliativa estafilocócica; **Spe:** Exotoxinas estreptocócicas; **SSA:** Superantígeno estreptocócico.

Segundo KOTBa, 1995 (10), a demonstração de que certos elementos V $\beta$  seletivamente interagem com uma proteína em particular não é uma evidência suficiente para confirmar a superantigenicidade da mesma, porque existem alguns exemplos de antígenos convencionais que também são reconhecidos preferencialmente por certos elementos V $\beta$ . Logo, para provar a evidência de estimulação superantigênica, é importante determinar que a resposta seja independente de outros elementos variáveis de TCR e demonstrar que a célula T responsiva exibe uma extensa e diversa região juncional em CDR3 da sua molécula TCR. Além disso, certos superantígenos podem estimular as células T em concentrações picomolares sendo essencial a confirmação de que esta atividade é mediada por proteínas de interesse e não por contaminantes.

## MECANISMO DE PATOGÊNESE

Acredita-se que a patogênese dos superantígenos associada a doenças seja mediada pela aberrante resposta imune acionada contra estas moléculas. A habilidade dos superantígenos em interagir com um grande número de células T e induzir a produção de níveis altos de linfocinas e monocinas inflamatórias tem levado a crer na sua implicação em várias doenças, como síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar e muitas doenças autoimunes (24, 25).

As citocinas organizam interações intercelulares e regulam a resposta imune, porém a produção excessiva pode ser muito danosa para o hospedeiro. Dentre as citocinas inflamatórias liberadas pelos superantígenos estão o Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), a interleucina 1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (27).

O TNF $\beta$  possui muitas atividades biológicas, dentre estas a produção de um estado trombogênico por permitir uma baixa atividade da trombina e por aumentar a ação de inibidores do plasminogênio (16). O TNF $\alpha$  também tem efeitos diretos sobre muitos tipos de células, podendo causar injúria tecidual pela ativação de células inflamatórias e regulação da expressão das moléculas de adesão. O TNF $\alpha$  pode causar um aumento na aderência de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos nas células endoteliais, levando a uma isquemia vascular, trombose e coagulação intravascular disseminada (27). Após a adesão, estes leucócitos liberam radicais livres de oxigênio, fosfolipase A, prostaglandina E2 e proteases que causam a ativação do

complemento e conseqüentemente a produção de C5a. Juntos, estes eventos contribuem para danos nas células endoteliais. A liberação de mediadores inflamatórios aumenta o influxo de neutrófilos e causa o extravasamento de leucócitos do sangue para os tecidos, levando a danos em diferentes órgãos. Em adição, a produção de radicais livres e óxido nítrico podem ativar os leucócitos e contribuir para a habilidade do TNF $\alpha$  de causar citotoxicidade direta em células endoteliais e induzir a vasodilatação e choque. Juntos estes eventos causam perda do tônus vascular, além de extravasamento de fluidos intravasculares para o espaço intersticial e hipotensão. A falência de múltiplos órgãos e o aumento da permeabilidade capilar são características do choque tóxico (10).

O TNF $\alpha$  também induz a liberação de outras citocinas como a interleucina-1 (IL-1), INF- $\gamma$ , e TNF- $\beta$  que são mediadoras de efeitos pré - inflamatórios similares. A IL-1 e INF- $\gamma$  são também relatadas pela sua habilidade em potencializar a ação de TNF- $\alpha$ . IL-1 induz febre, síntese de proteínas de fase aguda, neutrofilia e em altas doses pode induzir hipotensão e choque. Também tem sido mostrado sua ação na degranulação dos neutrófilos e produção de superóxidos. Mais tarde pode induzir a peroxidação de lipídeos e pode alterar a membrana das células endoteliais. A superprodução de IL-1 promove a aderência de leucócitos e estimula as células do endotélio a produzir prostaglandinas e fator de estimulação de plaquetas (4).

As citocinas interagem entre si e tem muita influência na resposta global. A presença de níveis elevados de IFN- $\gamma$ , aumenta os níveis de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6. A produção de TNF- $\beta$  regula os níveis de IFN- $\gamma$ . (13). O resultado da liberação de IFN- $\gamma$ , com as várias citocinas de diferentes superantígenos, pode influenciar no efeito da infecção pela potencialização dos níveis e cinéticas de liberação de outras citocinas inflamatórias. Por exemplo, em uma infecção viral que é precedida ou sobreposta por uma infecção bacteriana, os altos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pela primeira infecção aumentam e prolongam os efeitos das citocinas inflamatórias liberadas pela segunda infecção (3).

A magnitude da resposta inflamatória das citocinas pode ser potencializada por outros componentes próprios da bactéria produtora do superantígeno. Este fato pode ser observado, por exemplo, pela ação da estreptolisina O que é produzida por todas as cepas de *Streptococcus pyogenes*. Esta produz um sinergismo com o superantígeno SPEa produzido por algumas cepas, aumentando a liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$ .

De acordo com recentes estimativas, citadas por Murray et al, 1995 (19), menos de 1 em 10.000 células T são estimulados via antígeno convencional. Em contraste, 1 em 5 de todas as células T pode ser estimulada por um superantígeno em particular, reforçando os aspectos anteriormente colocados em relação a intensidade da resposta imune frente aos superantígenos.

## **SUPERANTÍGENOS BACTERIANOS**

Muitas bactérias têm se mostrado suspeitas de produzir superantígenos. Entre os superantígenos mais bem caracterizados estão as toxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Entre estas destacam-se as enterotoxinas estafilocócicas (SE- sorotipos A-E,

G, H), toxina estafilocócica esfoliativa (ETA, ETB), exotoxinas piogênicas estreptocócicas (SPE- sorotipos A-C e possivelmente F- fator mitogênico), superantígeno estreptocócico (SSA) e toxinas estafilocócicas da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) (10).

As toxinas estafilocócicas SE e TSST-1, e toxinas estreptocócicas SPE e SSA estão em um grupo conhecido como superantígenos de toxinas pirogênicas (PTSAG). Tanto SPE quanto SSA são produzidas pelos estreptococos do grupo A, embora os grupos B, C, F e G também produzam, apesar de não estarem bem caracterizados. Todas essas toxinas possuem propriedades em comum, como a capacidade de induzir febre e são considerados os pirogênios mais potentes que existem. São capazes de induzir febre de 40° a 41° C em humanos. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está bem definido; se por ação direta da toxina no hipotálamo ou indução via interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) liberadas. Provavelmente os dois caminhos são responsáveis pela febre (4).

A propriedade mais bem estabelecida dos PTSAG é a capacidade de agir como superantígeno, estimulando as células T de maneira diferente dos antígenos convencionais.

Associadas às características de pirogenicidade e superantigenicidade, aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a um choque letal. Essas toxinas são capazes de interferir no clearance do fígado, e acredita-se que devido a um acúmulo de endotoxinas na circulação (e posteriormente liberação de citocinas) ocorra um bloqueio na habilidade do fígado em liberar endotoxinas, contribuindo para a letalidade na Síndrome do Choque Tóxico (10).

Outras proteínas também têm sido descritas como superantígenos. O *Mycoplasma arthritidis*, tem como superantígeno descrito o mitógeno de *Mycoplasma arthritidis* (MAM), o qual está envolvido em uma artrite crônica em roedores. Um superantígeno é também expresso pela *Yersinia pseudotuberculosis*, o YPM. Esta bactéria Gram negativa causa infecção gastrointestinal e linfadenite mesentérica, e tem sido isolada no Japão em pacientes com Síndrome de Kawasaki e em pacientes com poliartrite reativa (17).

Tem-se reportado alguns candidatos a superantígenos provenientes de *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium perfringes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*, que ainda necessitam confirmação usando proteínas recombinantes (17).

A Tabela 2 mostra os superantígenos bacterianos mais bem caracterizados e as doenças relacionadas.

**TABELA 2- SUPERANTÍGENOS E DOENÇAS RELACIONADAS**

Cepa produtora	Proteína	Doença associada
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEA a SEE TSST-1	Intoxicação alimentar, TSS TSS, Síndrome de Kawasaki
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SPEA e SPEC MF	TSS estreptocócica, febre escarlate Indefinido

<i>Mycoplasma arthritidis</i>	MAM	Artrite crônica em roedores
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YPM	Linfadenite mesentérica, Síndrome de Kawasaki, Artrite reativa

**SE:** enterotoxina estafilocócica; **TSS:** síndrome do choque tóxico; **TSST:** toxina da síndrome do choque tóxico; **SPE:** exotoxinas pirogênicas estreptocócicas; **MF:** fator mitogênico; **MAM:** mitógeno de *Mycoplasma arthritidis*; **YPM:** mitógeno derivado de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Fonte: Maillard e colaboradores, 1997.

## CARACTERÍSTICAS PARTICULARES DOS PRINCIPAIS SUPERANTÍGENOS BACTERIANOS

**Enterotoxinas Estafilocócicas (SE):** As enterotoxinas estafilocócicas (SE) estão envolvidas em gastroenterites conhecidas como intoxicação alimentar, na qual fica demonstrada a propriedade emética das mesmas. Estas toxinas estão também implicadas em casos de Síndrome do Choque Tóxico (22). Particularmente a SEB e SEC, causam aproximadamente 50% dos casos de síndrome do choque tóxico não menstruais (19).

As SE apresentam grande parte de sequências similares de aminoácidos primários e aproximadamente 14% das sequências são idênticas em todas as SE (22). Baseado nas sequências homólogas de aminoácidos as SE podem ser divididas em três grupos. O primeiro grupo é composto pela SE-B e 3 sub tipos da SE-C, que são 70% homólogas entre si e 46 a 68% com a SPE-A. O segundo grupo consiste da SE-A, SE-E e a menos similar SE-D; SE-A e SE-E possuem mais de 80% de sequências homólogas enquanto que a SE-D possui aproximadamente 54% de homologia. O terceiro grupo contém somente a SE-H. SE-F é a designação original para a TSST-1 e não é usada; a SE-G ainda esta sendo caracterizada (10, 19, 22).

**Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1):** A Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) foi a primeira toxina a ser demonstrada como causadora da Síndrome do Choque Tóxico (TSS) e ainda é a causa de aproximadamente 75% de todos os casos da doença, incluindo os casos menstruais. A TSST-1 não mostra sequências homólogas significantes com outras toxinas pirogênicas, somente as suas atividades biológicas (19, 22).

**Exotoxinas Pirogênicas Estreptocócicas (SPE):** As exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPEs) A, B e C, são responsáveis pela febre escarlate e erisipelas, e estão implicadas na Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócica (19).

Diferente das SE, as SPEs possuem uma sequência de aminoácidos pouco similares com outros superantígenos (com exceção da SPE-A que mostra similaridade em 50% das sequências com SE-B e os três subtipos de SE-C). É provável que a SSA, recentemente descrita, seja um membro da subfamília da SPE-A, baseado na similaridade das sequências de aminoácidos (22).

Experimentos feitos por FLEISCHER et al (1995), sugerem que a SPEB não é superantígeno. Testes realizados com formas recombinantes demonstraram que uma possível contaminação possa ter conferido a SPEB

uma ação superantigênica (5).

**Fator Mitogênico ( MF ):** Anteriormente designada SPEF, o fator mitogênico foi purificado da mesma cepa de *Streptococcus pyogenes* que foram isolados originalmente as SPE (A,B,C).

Esta proteína é produzida por todos os estreptococos do grupo A, mas não por outros estreptococos. Foi descrito como sendo um superantígeno ativando células T especificamente nas cadeias V $\beta$  2, 4, 8, 15 e 19 (5).

**Toxinas Esfoliativas (ET):** As toxinas esfoliativas (ET) liberadas por certas cepas de *Staphylococcus aureus*, conhecidas como ETA e ETB, induzem respostas diferentes das PTSAg. Estas duas toxinas possuem aproximadamente 40% de aminoácidos idênticos, e como a TSST-1, não possuem sequências similares a outros superantígenos. ETA e ETB são os agentes etiológicos da Síndrome da Pele Escaldada (SSSS), a qual provoca uma exfoliação generalizada da pele (19, 22).

FLEISCHER et al (1995), assim como feito para SPEB, relatou que as ETs não são superantígenos e que existe dúvida de como elas agem como mitógeno (5).

**Candidatos a Superantígenos Estreptocócicos:** Um candidato a superantígeno foi isolado da membrana citoplasmática do *Streptococcus pyogenes*. Esta proteína, denominada de Proteína Associada a Membrana Citoplasmática (CAP), estimula células T, preferencialmente em cadeias V $\beta$ 8. O uso de inibidores do processamento de antígenos não inibe a ação da CAP. A partir destes indícios, sugere-se que este seja um novo superantígeno bacteriano (5).

Duas proteínas de baixo peso molecular (LPM) foram isolados de *Streptococcus pyogenes* e são mitógenos para células T humanas. Outra proteína, a DPED, foi isolada de uma cepa de *Streptococcus pyogenes* associado a síndrome do choque tóxico. Ainda não há confirmação de que estas proteínas agem realmente como superantígenos (5).

## **DOENÇAS MAIS FREQUENTEMENTE RELACIONADAS AOS SUPERANTÍGENOS BACTERIANOS**

**Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócica:** A Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócica (TSS) é uma doença sistêmica aguda causada pelas enterotoxinas do *Staphylococcus aureus*, mais notadamente a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). As enterotoxinas SEB e SEC também são relacionadas, porém em menor frequência (19).

A TSS é caracterizada pelo envolvimento de múltiplos órgãos, pelo rápido aumento na temperatura (> 39° C), hipotensão e rachaduras de pele, como na febre escarlata em que há descamação por 1 a 2 semanas. (15, 19).

A incidência de casos de TSS foi relatada no começo dos anos 80, principalmente entre mulheres que usavam tampões de alta absorção. Os fatores pelos quais este grupo é mais susceptível a doença está relacionado com: 1) as condições de anaerobiose produzidas pelo tampão, o pH entre 6.5 -

8.0, a temperatura entre 37°-40°C e a possibilidade de baixos níveis de glicose que são condições adequadas para a produção da toxina; 2) alguns surfactantes aderidos no tampão aumentam a produção de toxinas e, 3) os tampões ligam-se ao magnésio e podem alterar a cinética dos microorganismos que produzem a toxina (19, 22).

De acordo com RAGO e SCHILIEVERT (1998), o risco de contrair a TSS aumenta conforme aumenta o grau de absorção do tampão. Os tampões que contém poliacrilato são menos associados com TSS do que tampões que não contém poliacrilato e com mesmo grau de absorção.

A TSST-1 foi a primeira toxina implicada na TSS, e quase todos os casos de TSS menstruais são causados pela TSST-1.

Os casos de TSS não menstrual são resultantes de alguma infecção por *Staphylococcus aureus*, incluindo infecção cutânea, infecção pós cirúrgica ou pós parto, infecção de tecidos moles, traqueite pós influenzae ou pneumonia. A TSST-1 é responsável por aproximadamente metade dos casos de TSS não menstrual, e as enterotoxinas SEB e SEC pelo restante (19, 22).

**Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócica:** A Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócica foi descrita pela primeira vez em 1987 em pacientes com infecção estreptocócica do grupo A localizada. Relatos de pacientes com infecção invasiva foram descritos posteriormente. Os sintomas são caracterizados por hipotensão, além de disfunção renal, envolvimento hepático, rash eritematoso, necrose de tecidos moles (“bactéria assassina”) coagulopatia e síndrome respiratória aguda. Outras manifestações clínicas tem sido demonstradas como faringite, celulite, osteomielite, peritonite, sepsis e infecção em feridas cirúrgicas. Geralmente a infecção se inicia via cortes da pele, após trauma ou após lesões associadas a Varicela, como observa-se em algumas crianças. Outro fator de risco é o uso de drogas antiinflamatórias esteróides, gravidez e pós parto (22).

Os estreptococos do grupo A possuem muitos fatores de virulência que são responsáveis pela infectividade do microorganismo, e que são importantes na Síndrome do Choque Tóxico. Por exemplo, a proteína M, fator associado a parede celular que permite uma atividade antifagocítica ao microorganismo, os sorotipos M1, M3 e M 18 estão envolvidos na doença. Existe uma prevalência de estreptococo grupo A produtor de SPEA envolvido na Síndrome. SPEC também contribui para a doença porém em menor proporção e o papel da SPEB não está claro pois foi encontrada em casos de pacientes com a Síndrome e em pacientes sem a mesma (19, 22). Segundo NORRBY-TEGLUND et al (1996), o superantígeno estreptocócico (SSA) também está envolvido (20).

Os estreptococos dos grupos B, C, F, e G também estão envolvidos, porém não estão bem caracterizados (19).

**Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica:** A Síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS) é uma doença caracterizada por uma exfoliação generalizada da pele, causada pelas toxinas esfoliativas A e B (ETA e ETB) produzidas pelo *Staphylococcus aureus*. Estas toxinas não causam efeitos em múltiplos órgãos, não induzem ao choque, e parecem ser específicas para o extrato granuloso da epiderme. O mecanismo pelo qual estas toxinas causam a exfoliação ainda não está determinado. Alguns estudos mostram que a

atividade da ET leva a um acúmulo intercelular de cera e subsequentemente a exfoliação da epiderme, enquanto que outros acreditam que as toxinas tem um efeito direto na adesão intercelular como desmossomos, resultando em uma ruptura intraepidérmica (19, 22).

**Intoxicação Alimentar:** A intoxicação alimentar é associada à ingestão de alimentos contaminados ou deteriorados e é caracterizada por vômito e diarreia.

As exotoxinas pirogênicas estafilocócicas representam a causa mais comum desta doença, devido a estas toxinas serem resistentes a protease e adaptarem-se entericamente, podendo induzir vômito e diarreia.

A doença tem sido relacionada à liberação de histamina pelas células do intestino. É possível que as SEs sejam mediadoras na infecção alimentar pela ação direta nas células do intestino ou indiretamente pela indução da liberação de citocinas inflamatórias pelas células T que podem exacerbar os sintomas (10).

**Doença de Kawasaki:** É conhecida como uma síndrome nos linfonodos mucocutâneos e afeta primariamente crianças entre 6 meses e 8 anos. A doença é uma vasculite multissistêmica caracterizada por febre prolongada (no mínimo 5 dias), alterações na pele e membranas mucosas como edemas, rash, conjuntivite, descamação da pele e eritema de orofaringe, lábios e extremidades. A complicação mais séria da vasculite é a anormalidade coronariana. No Japão e nos Estados Unidos, esta doença é a causa mais comum de comprometimento cardíaco adquirido em crianças (19).

Segundo SCHIFFENBAUER et al (1998), embora a Síndrome de Kawasaki (SK) ainda não seja considerada autoimune, anticorpos anti antígenos endoteliais têm sido identificados (23). Muitos investigadores têm demonstrado que imunoglobulinas intravenosas são efetivas no tratamento da doença e que anticorpos presentes na preparação inibem a ativação de células T por superantígenos "in vitro".

Embora o agente etiológico da doença de Kawasaki seja desconhecido, muitas linhas sugerem que é causada por uma doença secundária. A fase aguda possui características clínicas parecidas com as da Síndrome do Choque Tóxico, o que sugere que esta esteja envolvida com uma infecção microbiana.

Na análise do sangue periférico de pacientes em fase aguda, encontrou-se níveis elevados de células T  $V\beta 2$  e em menor frequência  $V\beta 8.1$  e  $V\beta 8.2$  em TCR.

Os estudos citados por MURRAY et al, 1995 (19), sugerem que superantígenos produzidos por *Staphylococcus aureus* e estreptococos principalmente grupo A, contribuem na patogênese da doença, pois 11 dos 16 pacientes isolados com SK estavam infectados com *Staphylococcus aureus* que produziam TSST-1 (estimulam preferencialmente TCR  $v\beta 2$ ) e 2 dos 16 estavam infectados com estreptococo produtor de SPEs B e C ( $V\beta 8$  e  $V\beta 2$  especificamente).

MAILLARD et al (1997), citam que em alguns casos de SK isolados no Japão, foi isolado *Yersinia pseudotuberculosis* produtora de YPM (17).

## **SUPERANTÍGENOS ASSOCIADOS A VÍRUS E OUTROS MICROORGANISMOS**

A atividade superantigênica tem sido reportada em muitos vírus, porém a proteína responsável ainda não está bem identificada em todos os casos. As evidências que suportam a existência de superantígenos verdadeiros são controversa para muitos vírus.

**VÍRUS DA RAIVA:** A proteína do nucleocapsídeo (NC) do vírus da raiva foi descrita como sendo um superantígeno em humanos, estimulando as células T V $\beta$ 8.

A estimulação de células T pelo superantígeno parece facilitar a transmissão viral do sítio de infecção (tecido muscular) para a extremidade do nervo. Em camundongos infectados pelo vírus, células reativas ao superantígeno foram cruciais para o aparecimento da paralisia dos membros, um sintoma resultante da injúria imunopatológica dos nervos periféricos. O mecanismo pelo qual as células T estimuladas pelos superantígenos promovem a transmissão do vírus da raiva ainda não está bem explicado. Está claro que as citocinas secretadas pelas células T estimuladas facilitam a transmissão viral (7, 17).

O superantígeno NC parece contribuir para a imunopatologia no sistema nervoso central, modulando a resposta antiviral; contudo a magnitude da significância dos efeitos "in vivo" não são claros (17).

**EPSTEIN-BARR VÍRUS (EBV):** O EBV é um herpes vírus com DNA de dupla fita. Possui tropismo pelas células B sendo internalizado pelo receptor. Dois tipos de infecção celular podem ocorrer: infecção lítica, que leva a replicação viral e lise das células do hospedeiro e infecção latente, levando a infecção crônica das células do hospedeiro.

O EBV é transmitido via saliva e infecta células epiteliais da nasofaringe e linfócitos B; é endêmico em todas as populações adultas. A maioria das pessoas são expostas ao EBV na infância e carregam o vírus sem consequências aparentes. Entretanto, a infecção por EBV quando ocorre na adolescência, leva aproximadamente 50% dos indivíduos infectados a desenvolverem a mononucleose infecciosa (IM), uma doença linfoproliferativa auto-limitada. As células CD8 são responsáveis pela linfocitose no auge da IM, mas as CD4 são ativadas inicialmente. A natureza auto-limitada da proliferação de células T permite ver a ação como induzida por um superantígeno (7).

SUTKOWSKI et al (1996), através de ensaios "in vitro" demonstraram que o Epstein Barr Vírus age como um superantígeno. Estes estudos evidenciaram uma forte resposta primária de células T ao vírus. Foram usadas células linfoblásticas de adultos, as quais virtualmente seriam EBV soropositivas. Não poderia ser excluída uma resposta de memória ao antígeno. Para excluir esta possibilidade foi feito o mesmo teste com células de cordão umbilical as quais são 100% derivadas do feto e portanto EBV negativos, pois os herpes vírus não são transmitidos ao feto durante a gravidez. A mesma proliferação de células T fetal também foi observada como nas células de adultos (28).

Neste ensaio foram também analisadas as moléculas TCR V $\beta$

das células T após quatro horas de estimulação “in vitro” e foi demonstrado que células T V $\beta$ 13 são ativadas preferencialmente.

E finalmente, para classificar EBV como superantígeno foi necessário testar sua dependência de apresentação pelo MHC de Classe II. Foi demonstrado usando-se anticorpos anti classe II, os quais bloquearam a estimulação pelo EBV.

As possíveis vantagens para o EBV codificar superantígenos estão relacionadas ao estabelecimento e manutenção de latência. SUTKOWSKI et al sugerem que o papel das células T ativadas pelos superantígenos é prover sinais necessários para o crescimento e sobrevivência de células B infectadas por vírus latentes (28).

O EBV tem sido associado a doenças auto-imunes como a Síndrome de Sjögren, a qual é associada a altos níveis de herpes vírus nos pacientes. Foi reportado o achado de células T V $\beta$  13 em lesões de pacientes com esta doença, o que indica uma possível ação do EBV associado a um superantígeno.

**CITOMEGALOVÍRUS (CMV):** Este vírus, assim como o EBV, também está presente na maioria da população. A exposição ao CMV durante a adolescência leva a sintomas parecidos com os da mononucleose infecciosa, caracterizado pela intensa proliferação de células T, a qual é auto-limitada, enquanto que a infecção durante a infância não apresenta sintomas. As células T preferencialmente ativadas pelo CMV são as V $\beta$ 12 (7).

A atividade de superantígeno do CMV vem de estudos em pacientes com AIDS. Foi descoberto que o HIV 1 aumenta sua replicação em pacientes com células T V $\beta$ 12 e infectados pelo CMV, o que não ocorre em pacientes negativos para o CMV (7, 17).

A proteína responsável pela ação superantigênica ainda não foi identificada e a deleção de células TV $\beta$ 12 não foi observada em pacientes cronicamente infectados (17).

## **SUPERANTÍGENOS E AUTOIMUNIDADE**

A habilidade dos superantígenos de ativar o sistema imune sugere que eles tenham um papel no curso das desordens autoimunes, o qual envolve o seu efeito de proliferação das células T e sua habilidade em induzir citocinas inflamatórias e alterar a regulação da liberação das mesmas.

Células T autoreativas no sangue de indivíduos saudáveis, que são anérgicas ou estão presente em baixas quantidades, podem potencialmente ser ativadas em certas situações. A habilidade dos superantígenos de ativar células T baseados no seu tipo V $\beta$  e especificidade a TCR, pode causar uma proliferação de células T autoreativas, levando a uma quebra da autotolerância e induzindo a autoimunidade. Em adição, a interação de superantígenos com moléculas MHC classe II pode ativar células B e macrófagos a secretar excessivas quantidades de citocinas inflamatórias com liberação de óxido nítrico, expressão de moléculas de adesão, e regulação na expressão de moléculas coestimulatórias, aumentando o dano tecidual. Algumas citocinas inflamatórias liberadas pelos superantígenos, incluindo TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  podem aumentar esses efeitos pelo aumento da adesão de leucócitos e regulação na

expressão de MHC. Essas reações levam a uma apresentação anormal de autoproteínas e ativação de células T autoreativas. Além disso, a habilidade dos superantígenos em ativar células que expressam molécula classe II sugerem que eles podem ativar células B e gerar autoanticorpos (11).

## DOENÇAS RELACIONADAS A SUPERANTÍGENOS E AUTOIMUNIDADE

**Psoríase:** A psoríase é uma doença inflamatória crônica na pele que afeta aproximadamente 2% da população em geral. As lesões características da pele consistem em placas eritematosas persistentes com infiltração de células inflamatórias e aumento da proliferação de queratinócitos. A ativação imune, particularmente de células T, tem um papel crítico na patogênese da psoríase. Este conceito é suportado pela seguinte observação: primeiro, a avaliação histológica de lesões de pele demonstraram uma hiperplasia epidérmica precedida pela infiltração de linfócitos T e macrófagos na pele. Além disso, clones de linfócitos T proliferam nas lesões da psoríase, liberando fatores de crescimento que induzem a proliferação de queratinócitos. Segundo, certos subtipos de psoríase exibem uma forte associação com antígenos HLA específicos. Terceiro, drogas imunossupressoras que inibem a ativação de células e secreção de citocinas como anti CD3, corticosteróides e ciclosporina A são muito efetivos no tratamento da psoríase (13).

Estes dados suportam o conceito de que a psoríase é mediada imunologicamente, embora o gatilho para estes eventos ainda não se encontra esclarecido. Psoríase Gutata é uma forma bem definida de psoríase que aparece repentinamente e em geral está associada à história de infecção estreptocócica anterior, ou títulos aumentados de anticorpos anti-estreptocócicos no soro (13).

LEWIS et al (1993) descreveram a presença de muitas células T  $V\beta$  em lesões agudas de pele de pacientes com psoríase gutata (14).

A associação entre psoríase e infecção estreptocócica, bem como a observação que certos tipos de células T  $V\beta$  são predominantes nas lesões, sugere que superantígenos estreptocócicos estejam envolvidos na patogênese da doença.

O que é proposto por VALDIMARSSON et al (1995) é que as lesões da psoríase são iniciadas por exotoxinas (superantígenos) que ativam as células T. Estas lesões persistem porque as células T reagem com a proteína M estreptocócica (antígeno convencional) e com um determinante na pele, que possivelmente é uma variante da queratina. As citocinas liberadas pelas células T estimuladas pelo superantígeno podem favorecer um aumento na reação cruzada com um autoantígeno, induzindo a ativação de células T autoreativas. Logo, os TCR  $V\beta$  específicos determinados pelo superantígeno, podem ser mantidos pelas células T em lesões da psoríase (29).

**Artrite Reumatóide:** Estudos de artrite autoimune em modelos animais suportam o conceito de que os superantígenos podem contribuir para o curso da doença. O superantígeno do *Mycoplasma arthritidis* (MAM) foi mostrado como um indutor de exarcebação de colágeno em ratos (23).

Em humanos com artrite reumatóide (AR), evidências da contribuição de superantígenos são menos diretas pois um estudo mostrou

baixa percentagem de células T V $\beta$ 14 em líquido sinovial. Um segundo estudo avaliou o repertório V $\beta$  na AR, e encontrou três genes TCR na maioria das amostras sinoviais examinadas. Um terceiro estudo demonstrou que a SED poderia estar direcionando as células B a secretar o fator reumatóide.

Muitos estudos *in vitro* têm analisado a interação entre células sinoviais, células T e superantígenos, sugerindo que estes últimos têm uma influência no curso da artrite induzida por antígenos, podendo atuar significativamente na habilidade das células sinoviais ativarem células T (23).

## **CONDUTA TERAPÊUTICA NAS DIVERSAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS A SUPERANTÍGENOS**

Na maioria dos casos de choque tóxico por estafilococos e estreptococos, quando diagnosticados precocemente, o uso de antibióticos apropriados é indicado como terapêutica. Em estágio avançado da doença, terapias direcionadas para bloquear a resposta imune são mais efetivas do que terapias direcionadas ao patógeno. No entanto, uma conduta terapêutica adequada requer um conhecimento aprofundado sobre a interação hospedeiro/patógeno e do mecanismo de patogênese do choque tóxico (10).

Levando-se em conta o papel central da TNF- $\alpha$  no choque tóxico, é lógico propor que terapias anti-citocinas seriam mais efetivas na intervenção clínica. É possível que, bloqueando sua síntese com drogas como a Talidomida ou pela administração de receptores solúveis ou anticorpos neutralizadores, a progressão da doença possa diminuir e as manifestações sistêmicas sejam amenizadas (10).

Outra estratégia utilizada é bloquear outros mediadores do choque tóxico como o óxido nítrico, que pode ser utilizada sozinha ou em associação com anticitocinas.

Em casos de infecções severas e choque tóxico por estreptococos, observou-se a ausência de anticorpos neutralizadores dos superantígenos, o que correlacionou-se com formas severas de choque tóxico. Por este motivo sugere-se que talvez uma vacina possa ser desenvolvida para uso nessas doenças. No entanto, nem sempre se conhece qual superantígeno está envolvido e conseqüentemente qual vacina seria mais eficaz. Em muitos casos a ação dos superantígenos pode ter seu efeito aumentado pelo sinergismo com outros fatores de virulência que também contribuem para o processo e logo devem ter a sua atividade igualmente neutralizada.

O uso de imunoglobulinas intravenosas para o tratamento de choque tóxico por Gram positivos também está sendo estudado e parece ser eficaz. Estas preparações de imunoglobulinas contêm anticorpos neutralizadores de toxinas e citocinas, além de moléculas solúveis de HLA. Estas moléculas parecem competir com a molécula MHC de classe II inibindo a sua ligação com superantígeno. Esta inibição interfere na capacidade do superantígeno de produzir excessivas quantidades de citocinas inflamatórias. No entanto mais estudos são necessários para comprovar a sua eficácia quando administrada em diferentes fases da doença (10).

Em relação a autoimunidade, apesar de ainda só existirem evidências indiretas do papel do superantígeno, é possível especular uma terapêutica que diminua a progressão dessas doenças. Se uma particular

cadeia V $\beta$  da molécula TCR é suspeita de estar envolvida na ativação pelo superantígeno, é possível que estas células sejam fisicamente e funcionalmente eliminadas, usando anticorpos anti V $\beta$  específicos (10).

## CONCLUSÕES

A descoberta dos superantígenos e sua potente ação no sistema imune gerou um grande impacto na área científica. O entendimento do seu modo de ação ajudou a revelar o mecanismo de patogênese de inúmeras doenças que permaneceu obscuro por anos.

Estas proteínas, originárias de vários microorganismos, elucidaram a fisiopatologia de doenças como o choque tóxico e intoxicação alimentar, entre outras. A descoberta que toxinas bacterianas são responsáveis pelo desenvolvimento destas patologias e dos fortes efeitos apresentados pelo organismo, direciona o tratamento e permite compreender as consequências destes efeitos.

Cabe enfatizar que os efeitos dos superantígenos podem variar consideravelmente dependendo do hospedeiro e da interligação entre o sistema imune individual e o patógeno. Logo, deve-se evitar conclusões generalizadas e uma superestimação destas moléculas, porque nem todos os superantígenos comportam-se da mesma maneira. A atividade biológica é dependente do hospedeiro, da idade, de situações de stress, mudanças hormonais e infecções concomitantes (10).

O protótipo de superantígenos são as exotoxinas pirogênicas produzidas pelo *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Muitas proteínas candidatas a superantígeno têm sido descritas em bactérias, vírus e protozoários.

Segundo uma revisão feita por FLEISHER et al, 1995 (5), a descoberta dos superantígenos levou a uma expectativa na busca de novos representantes. Segundo o autor, a expectativa aliada ao apelo da designação “superantígeno” levou a um número de candidatos reportados que excedem o número de superantígenos que realmente existem.

A descoberta de um novo superantígeno deve ser provada através do uso de proteínas recombinantes. Isto é necessário para excluir a possibilidade de contaminação com outras proteínas, daquelas que realmente têm ação superantigênica.

O papel dos superantígenos na terapêutica tem sido muito estudado e o seu uso no tratamento do câncer e de doenças infecciosas muito discutido.

Ainda existem muitas facetas para serem descobertas sobre essas moléculas. Os avanços científicos e tecnológicos permitirão a caracterização de novos superantígenos e certamente o conhecimento dessas proteínas contribuirá para um melhor entendimento do sistema imune, da interação hospedeiro/patógeno e da etiologia de muitas doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baccala, R.; Komo, D.H.; Walker, S.; et al. Genomically imposed and somatically modified human thymocyte V $\beta$  gene repertoire. **Proc Natl Acad Sci** 88:2908-2912, Usa, 1991.
2. Bunning, V. K.; Lindsay, J.A.; Archer D. L. Chronic health effects of microbial foodborne disease. **World Health Stat Q** 50 (1-2) :51-6, 1997.
3. Cowan, M.R.; Primm, P.A.; Scott S.M.; Abramo T.J.; Wiebe R.A. Serious group a beta-hemolytic streptococcal infections complicating varicella. **Ann Emerg Med** 23: 818-822, 1994.
4. Dinarello, C. ; Wolff, S.M. The role of interleukin-1 in disease. **N Engl J Med** 328: 106-113, 1993.
5. Fleisher, B.; Gerlach, D.; Fuhrmann, A.; et al. Superantigens and pseudosuperantigens of gram positive cocci. **Med Microbiol Immunol** 184: 1-8, 1995.
6. Hall, B. L.; Finn, O.J. PCR- based analysis of the T cell receptor V $\beta$  multigene family: experimental parameters affecting its validity. **Biotechniques** 13: 248-257, 1992.
7. Huber, B.T.; Hsu, P.N.; Sutkowski, N. Virus encoded superantigens. **Microb Rev** 60(3): 473-482, 1996.
8. Kawabe, Y.; Ochi, A. Selective anergy of V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD4 t cells in *Staphylococcus* enterotoxin b-primed mice. **J Exp Med** 172: 065-1070, 1990.
9. Kotzin, B. L. Superantigens and their role in disease. **Hosp Pract** 15: 59-70, 1994.
10. Kotba, M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. **Clin Microb Rev** 8(3) 411-426, 1995.
11. Kotbb, M. Short analytical review. Infection and autoimmunity: a story of the host, the pathogen, and the copathogen. **Clin Immunol and Immunopat** 74(1): 10-22, 1995.
12. Kotb, M.; Watanabe-Onishi, R.; Wang, B.; et al. Analysis of the TCR V $\beta$  specificities of bacterial superantigens using PCRr. **Imunomethods** 2:33-4, 1993.
13. Leung, D. Y.M.; Travers J. B.; Giorno R. et al. Evidence for a streptococcal superantigen process in acute guttate psoriasis. **J Clin**

**Invest** 96: 2106-2112, 1995.

14. Lewis, H. M., Baker, B. S. , Bokth, S. et al. Restricted T-cell receptor V $\beta$  gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. **Br J Dermatol** 129: 514 - 520, 1993.
15. Lierde, S. V.; Leeuwen, J. V.; Ceuppens, J. et al. Toxic shock syndrome without rash in a young child: link with syndrome of hemorrhagic shock and encephalopathy. **J Pediatr** 131: 130-4, 1997.
16. Lentz, S. R; Tsiang , M. e J. E. Sadler. Regulation of trombosmodulin by tumor necrosis factor alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional. **Mechanisms Blood** 77: 542-550, 1991.
17. Maillard J.; Luthi F.; Achaorbea H.; et al. Role of the immune response induced by superantigens in the pathogenesis of microbial infections. **Parasitology** 115: 567-578, 1997.
18. McCormack, J. E.; Callahan, J.E.; Kappler J.; Manack, P.C. Profound deletion of mature T cells in vivo by chronic exposure to exogenous superantigen. **J Immunol** 150: 3785-3792, 1993.
19. Murray, D. L.; Ohlendorf, D. H.; Schlievert P. M. Staphylococcal and streptococcal superantigens: their role in human disease. **Asm News** 61(5) 229-235, 1995.
20. Norrby-Teglund, A.; Kaul, R.; Low D. E. et al. Plasma from patients with severe invasive group a streptococcal infections treated with normal polyspecific IgG inhibits streptococcal superantigen-induced T cell proliferation and cytokine production. **J Immunol** 156: 3057-3064, 1996.
21. Ochi, A; Yuh, K; Migita; K. Not every superantigen induces tolerance in vivo. **Semin Immunol** 5: 57-63, 1993
22. Rago, J.V.; Schlievert P.M. Mechanisms of pathogenesis of staphylococcal and streptococcal superantigens. **Curr Top Microbiol Immunol** 225: 81-97, 1998.
23. Schiffenbauer, J.; Soos J.; Johnson H. The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders. **Immunol Today** 3: 117-120, 1998.
24. Schlievert, P.M. Role of superantigens in human disease. **J Infect Dis** 167: 997-1002, 1993.
25. Sissons, J.G. Superantigens and infectious disease. **Lancet** 341: 627-629, 1993.
26. Skov,L.; Baadsgaard, O. Superantigens, do they have role in skin

- diseases? **Arch Dermatol** 131: 829-832, 1995.
27. Stevens, D.L.; Bryant, A.; Hackett, S.P. Sepsis syndromes and toxic shock syndromes: concept in pathogenesis and perspective of future treatment strategies. **Curr Opin Infect Dis** 6: 374-383, 1993.
  28. Sutkowski, N.; Palkama, T.; Curli, C. et al. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. **J Exp Med** 184: 971-980, 1996.
  29. Valdimarsson, H.; Baker, B.S.; Jónsdóttir, I. et al. Psoriasis: A T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? **Immunol Today** 16(3): 145-149, 1995.
  30. Watanabe - Ohnishi, R.; Mc Geer, A.; Stevens, D. L. et al. Selective depletion of V $\beta$ -bearing T cells in patients with severe invasive group A streptococcal infections and streptococcal toxic shock syndrome. **J Infect Dis** 171: 74-84, 1995.
  31. Webb, S. R.; O'Rourke, A. M. O.; Sprent, J. Factors influencing the fate of T cells responding to MHC antigens. **Semin Immunol** 4:329-336, 1992.

## Piedra Negra – Relato de casos Case report

Lima, E.O<sup>1</sup> ; Oliveira, N.M.C<sup>2</sup> ; Pontes, Z.B.V.S<sup>1</sup> ; Carvalho, M.F.F.P<sup>2</sup> ; Guerra, M.F.L<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Professor da disciplina de Micologia –UFPB-CCS-DCF

<sup>2</sup> Farmacêutico – bioquímico do Laboratório de Micologia – UFPB-CCS-DCF

<sup>3</sup> Médico – Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba

RESUMO – Piedra negra é uma infecção causada por um ascomiceto, *Piedraia hortae*, que se caracteriza pelo aparecimento no terço distal dos cabelos de nódulos fusiformes, de consistência dura e coloração preta constituídos por massas compactas e organizadas de fungos. No homem, a piedra negra ocorre em regiões tropicais e subtropicais com precipitações pluviais abundantes, temperaturas elevadas e alta umidade do ar. No presente trabalho, os autores apresentam seis casos de piedra negra observados em pacientes atendidos no Laboratório de Micologia da UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – Paraíba – Brasil.

PALAVRAS – CHAVE – Piedra negra; *Piedraia hortae*

SUMMARY - Black piedra is a hair infection caused by *Piedraia hortae*. It is characterized by the formation of firmly attached black and hard nodules around the hair shaft. In man, black piedra occurs in the tropical and subtropical regions of the world, areas with abundant rainfall and high atmospheric temperatures. Hairs with black piedra were isolated from patients in the Mycology Laboratory from the UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – Paraíba - Brasil. A total of six cases have been investigated and the results are presented and discussed by the authors.

KEY WORDS – Black piedra; *Piedraia hortae*.

### INTRODUÇÃO

O termo piedra é utilizado para designar alterações patológicas da parte extrafolicular e aérea dos pelos, caracterizadas clinicamente por nódulos de consistência dura, de coloração negra ou esbranquiçada e produzidas por fungos do gênero *Trichosporon* (piedra branca) e *Piedraia* (piedra negra). Ambas são distintas não só pelos seus agentes etiológicos, mas também pela sua distribuição geográfica e epidemiologia<sup>1</sup>.

A piedra negra caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos fusiformes, arenosos, visíveis ou não a olho nu, escuros, duros, muito aderentes, constituídos por massas compactas e organizadas de fungos no terço distal de fios de cabelos<sup>2</sup>. O agente etiológico é um ascomiceto, *Piedraia hortae* (BRUMPT) FONSECA & AREA LEÃO<sup>3</sup>, cujo crescimento se faz na superfície da haste pilosa e dentro da bainha do fio de cabelo, tornando-se enfraquecido e, às vezes, quebrando na zona parasitada<sup>2</sup>.

Os principais fatores que contribuem para a incidência da micose são as precipitações pluviais abundantes, temperaturas elevadas e altos níveis de umidade do ar<sup>4</sup>. No homem, a piedra negra ocorre em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido registrada em países da América Latina (Suriname<sup>5</sup>, Venezuela<sup>6</sup>, Paraguai<sup>7</sup>, Argentina<sup>8</sup> e Uruguai<sup>9</sup>) e Ásia (Indonésia<sup>11</sup>, Indochina<sup>12</sup>, Malásia<sup>13</sup> e Tailândia<sup>14</sup>). No Brasil, há registros na literatura de casos ocorridos nos estados do Amazonas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Pará e Mato Grosso<sup>4,10,11,16,17,18,19</sup>.

O presente trabalho visa registrar 6 casos de piedra negra comprometendo o fio de cabelo de adultos e crianças, diagnosticados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

### MATERIAL E MÉTODOS

O exame micológico direto dos cabelos contendo os nódulos enegrecidos, com hidróxido de potássio a 20%, revelou a presença de ascos contendo ascosporos ao longo dos fios de cabelo, característicos de *Piedraia hortae*. Fragmentos de pelos infectados foram semeados em agar Sabouraud-

dextrose, incubados à temperatura ambiente. Após uma semana foi observado o desenvolvimento de uma colônia negra, de centro elevado e cerebriforme.

## RELATO DOS CASOS

### Caso 1

**B. F. P.F.**, sexo feminino, negra, 30 anos, procedente de João Pessoa, atendida em 1993 no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley, apresentava nódulos duros, escuros e fortemente aderidos ao cabelo. Após confirmação do diagnóstico, a paciente foi encaminhada à Dermatologia para tratamento.

### Caso 2

**B. F. S.**, sexo feminino, negra, 4 anos, estudante, morando em João Pessoa, proveniente de consultório particular em 1994, foi atendida no Laboratório de Micologia, apresentando nódulos escuros e duros ao longo dos cabelos. No exame micológico direto e cultura ficou constatado que se tratava de um caso de pedra negra tendo a paciente sido submetida ao tratamento específico para a micose.

### Caso 3

**M. S. J. S.**, sexo feminino, negra, 09 anos, estudante, procedente de João Pessoa, atendida no ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley em 1996, apresentava pequenos nódulos escuros envolvendo completamente a haste dos cabelos. Após exame micológico, foi diagnosticado como pedra negra e a paciente foi encaminhada à Dermatologia para tratamento.

### Caso 4

**A. M. V. M.**, sexo feminino, branca, 7 anos, estudante, procedente de João Pessoa, proveniente de consultório particular em 1997, procedente de João Pessoa, foi atendida no Laboratório de Micologia com grande quantidade de nódulos, duros, negros e aderidos à haste dos pêlos do couro cabeludo. O exame micológico revelou a presença de estruturas compatíveis com nódulos de pedra negra, confirmado através de cultura micológica.

### Caso 5

**S.S.**, sexo feminino, negra, doméstica, 33 anos, procedente de João Pessoa, atendida em ambulatório da rede pública estadual, foi atendida no Laboratório de Micologia em 1998, apresentando queixa nódulos aderidos ao cabelo e que ao pentear fazia muito barulho. Foram coletados vários fios parasitados e o exame micológico revelou a presença de estruturas fúngicas compatíveis com pedra negra e confirmado através de cultura.

### Caso 6

**P. J. Q. M.**, sexo masculino, branco, 17 anos, estudante, procedente de João Pessoa, atendido na rede particular, foi atendido no Laboratório em 1998, apresentando nódulos escuros e duros aderidos ao cabelo, diagnosticado através do exame direto como pedra negra e confirmado pela cultura micológica.

## DISCUSSÃO

Casos de pedra negra têm sido registrados em países da América Latina<sup>5,6,7,8,9</sup>. No Brasil, o trabalho realizado por FISCHMANN (1965)<sup>10</sup> em Manaus, revelou que a micose era endêmica nessa região. Através de investigação em comunidade indígena localizada no Parque Nacional do Xingu, FISCHMANN (1973) reafirmou o caráter endêmico da pedra negra. Das 120 amostras estudadas, 106 foram positivas ao exame direto, obtendo-se 98 culturas de *Piedraia hortae*<sup>4</sup>.

PECHER, CASTRO & BORRAS (1982), investigando micoses superficiais em 159 escolares de um vilarejo localizado na fronteira Brasil-Colômbia na região amazônica ocidental, encontraram uma prevalência de 21,38%<sup>15</sup>. Dentro dessa mesma linha de investigação, COIMBRA & SANTOS (1989), realizaram importante estudo epidemiológico em comunidade indígena da região norte, e de um total de 130 índios examinados, a pedra negra foi encontrada em 56,9% dessa população<sup>16</sup>. Por outro lado, há trabalhos publicados sobre pedra negra com número limitado de casos<sup>9,19</sup>.

O presente trabalho inclui o estudo de seis casos de parasitismo diagnosticados no Laboratório de Micologia e observados exclusivamente em fios de cabelos do couro cabeludo, o que parece estar em conformidade com os outros autores<sup>4,10,15,18</sup>. Em relação ao sexo, a micose foi verificada predominantemente em pacientes do sexo feminino, coincidindo com os dados publicados na literatura<sup>15,19</sup>. A predominância de casos de pedra negra em pacientes do sexo masculino foi encontrada por ALMEIDA (1916)<sup>18</sup>. Registrados na literatura, existem resultados que mostram não haver diferenças de sexo em

pacientes portadores de piedra negra<sup>4,10,15</sup>. Em relação à idade, dos seis casos diagnosticados em nosso laboratório, quatro deles foram verificados em pacientes com idade variando de 4 a 17 anos, demonstrando dessa forma a predominância da micose em crianças e jovens adultos. Dados semelhantes foram obtidos em trabalho realizado por outros pesquisadores<sup>20,10,16</sup>.

Apesar da Paraíba possuir condições bioclimáticas que favorecem o aparecimento do agente etiológico da piedra negra, poucos casos têm sido verificados em nosso meio. Nesse sentido, acreditamos que os seis casos diagnosticados no Laboratório de Micologia da UFPB, tenham sido os primeiros registrados na literatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Warnock, D.W. & Richardson, M.D.** Fungal Infection : Diagnosis and Management. Blackwell Scientific Publications – Oxford, 1993
2. **Esteves, J. A. , Cabrita, J.D & Nobre, G.N.** Piedras. In: Micologia Médica 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p.572-577.
3. **Fonseca, O da & Area Leão, A . C.** Sobre os cogumelos da piedra brasileira. Mem. Inst. Osv. Cruz, s4, p.124-125, 1928
4. **Fischmann, O .** Black piedra among brazilian indians. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.,v15, n.2, p.103-106, 1973.
5. **Aars, C.G.** Piedra. Arch.Derm. Syph. V 22, p. 401-409, 1930.
6. **Niño, F.L.** Contribución al estudio de tricopatias piedricas da Venezuela. Mycopathologia., v1, p7-11,1939
7. **Delamare, G. & Gatti, C.** La piedra del Paraguay. An. Fac. Cienc. Méd. (Paraguay)., v12, p10-33, 1928.
8. **Arias, C.** La piedra de la Argentina. Prensa Méd. Argent., v11, 394-402, 1924.
9. **Mackinnon, J.E & Schouten, G.B.** Investigaciones sobre las enfermedades de los cabellos denominadas Piedra. Arch. Soc. Biol. Montevideo, v10, p.227-266, 1942.
10. **Fischmann, O.** Black piedra in Brazil. A contribution to its study in Manaus (state of Amazonas). Mycopathol. Et Mycol. Appl. V25, p.201-204, 1965
11. **Wolff, J.W. & Gerlach, J.H.A.** Geneesk. Tydschr. V. Ned. Indië, v75, p.515, 1935.
12. **Connant, N.F., Smith, D.T., Baker, R.D., Callaway, J.L.; Martin, D.S.** Mannual of Clinical Mycology, 2<sup>nd</sup> ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa, 1959.
13. **Adam, B.A ., Soo-Hoo & Chong, K.C.** Black piedra in west Malaysia. Aust. J. Dermatol, v18, p.45-7, 1977.
14. **Kneedler, W.H.** Arch. Dermat. And Syph., v39, p.121, 1939.
15. **Pecher, S. A, Castro, G.B & Borrás, M.L.** Prevalência de micoses superficiais em escolares de localidades da região amazônica ocidental (fronteira Brasil-Colômbia). An. Bras. Dermatol., v57, n.1, p.13-18, 1982
16. **Coimbra, C. E. A & Santos, R. V.** Black piedra among the Zoró Indians from Amazônia (Brazil). Mycopathologia., v107, p.57-60, 1989.
17. **Brito, A . C. & Costa, C. A . A .** Piedra em Belém do Pará. Na. Brasil. Dermatol., v 41, p. 227-228, 1966.
18. **Almeida, H. M.** Contribuição para o estudo da piedra (Observação clínica de uma epidemia ocorrida no Distrito Federal). Tese. Fac. Med. Univ. Brasil, 1916
19. **Monteiro, C.M.; Machado, M.G.V & Abelha, M.C.S.** Piedra preta. Rev. Bras. Med., v51, n.3, p.412-416, 1994..
20. **Brumpt, E., & Langeron, M.** Considerations sur la piedra de l’Amerique du Sud a l’occasion d’un cas provenant du Vénézuéla. Description d’une espece nouvelle, *Piedraia venezuelensis*. Ann. Paras., v12, p.134-161, 1934.