



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

**RESPOSTA DE IgA, IgE, IgG E SUBCLASSES (IgG1 E IgG4) ESPECÍFICAS A
Candida albicans NO SORO E LAVADO VAGINAL DE PACIENTES COM
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

RICARDO JOSÉ VICTAL DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

UBERLÂNDIA-MG

2003

SISBI/UFU



1000209171



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

nov
518.15-008.2
C 331 C
TES/MEH

**RESPOSTA DE IgA, IgE, IgG E SUBCLASSES (IgG1 E IgG4) ESPECÍFICAS A
Candida albicans NO SORO E LAVADO VAGINAL DE PACIENTES COM
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

RICARDO JOSÉ VICTAL DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

**PROF. DR. ERNESTO AKIO TAKETOMI
ORIENTADOR**

UBERLÂNDIA-MG

2003

**Trabalho realizado nos Laboratórios de Imunologia da Área de Imunologia,
Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia, no Laboratório de Análises Clínicas do HC/UFU e no
Ambulatório de Alergia e Ginecologia da Unidade de Pesquisa em Alergia e
Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, sob apoio financeiro da
CAPES.**

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a Deus, por ter me dado o conhecimento e o auxílio necessário para a realização da mesma.

Dedico esta obra a toda a minha família, e em especial aos meus dois filhos Diogo e Heitor pelo seu modo de me ensinarem a viver.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato a todos que me auxiliaram a realizar esta obra, de forma compreensiva e competente, sem os quais não teria realizado.

SUMÁRIO	página
1-INTRODUÇÃO	01
1.1-FUNGOS E <i>Candida albicans</i>	01
1.2-RESPOSTA IMUNE AOS FUNGOS	03
1.3-ECOSSISTEMA VAGINAL	05
1.3.1-EPITÉLIO VAGINAL	05
1.3.2-MICROBIOTA COLONIZADORA	08
1.4-CANDIDÍASE VULVOVAGINAL	12
2-OBJETIVOS	14
3-PACIENTES E MÉTODOS	15
3.1-PACIENTES	15
3.2-SECREÇÃO VAGINAL	15
3.2.1-SWABS DE SECREÇÃO VAGINAL	16
3.2.2-AMOSTRAS DE LAVADO VAGINAL	16
3.3-AMOSTRAS DE SORO	16
3.4-TESTES IMUNOENZIMÁTICOS	18
3.5-ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3.6-NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	18
3.7-RETORNO ÀS PACIENTES	19
4-RESULTADOS	20
4.1-RESPOSTA DE ANTICORPOS IgA ANTI- <i>C. albicans</i>	22
4.2- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgE ANTI- <i>C. albicans</i>	24
4.3- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>C. albicans</i>	26
4.4- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG1 ANTI- <i>C. albicans</i>	28
4.5- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG4 ANTI- <i>C. albicans</i>	30
4.6-RELAÇÃO IgG1/IgG4	32
5-DISCUSSÃO	35
6-CONCLUSÕES	36
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8-ANEXOS	

RESUMO

Candidíase vulvovaginal é uma patologia ginecológica que se estima que a maioria das mulheres irá apresentar ao menos um episódio no decorrer de sua vida. *Candida albicans* é o fungo mais freqüentemente envolvido nesta patologia. O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de IgA, IgE, IgG e subclasses (IgG1, IgG4) anti-*C. albicans* no soro e lavado vaginal de mulheres com ou sem candidíase vulvovaginal para avaliar o papel destes anticorpos na imunopatogênese desta doença. Foram selecionadas 30 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (15 com cultura de secreção vaginal positiva para *C. albicans*, 11 com cultura negativa e 4 com cultura positiva para *Candida* não-*albicans*) e 12 mulheres controles assintomáticas. Amostras de soro e lavado vaginal foram obtidas para a detecção de anticorpos anti-*C. albicans* por ELISA. Os resultados mostraram que pacientes sintomáticas com cultura positiva apresentaram níveis de IgA específica significativamente maiores no lavado vaginal e menores no soro do que aquelas com cultura negativa. Níveis séricos de IgE específica foram extremamente baixos em relação ao lavado vaginal. Altos níveis de IgG total específica foram encontrados no soro e lavado vaginal em ambos os grupos, independente da presença ou ausência do fungo. Níveis de IgG1 e IgG4 específicas foram significativamente maiores somente no lavado vaginal de pacientes sintomáticas com cultura positiva, com uma relação IgG1/IgG4 ligeiramente maior, indicando que a resposta anticórpica de IgG1 possa estar predominantemente envolvida na resolução da infecção fúngica. Estes resultados indicam que existe uma resposta acentuada de IgA, IgG1 e IgG4 anti-*C. albicans* no lavado vaginal de pacientes sintomáticas com cultura positiva, sugerindo um importante papel destes anticorpos na resposta imune local estimulada pela presença do fungo.

SUMMARY

Vulvovaginal candidiasis is a gynecological disorder that affects the majority of the women presenting at least one episode during their life. The most prevalent etiological agent is *Candida albicans*. The aim of this study was to determine the levels of IgA, IgE, IgG and subclasses (IgG1, IgG4) specific to *C. albicans* in serum and vaginal washes from women with or without vulvovaginal candidiasis in order to evaluate the role of these antibodies in the immunopathogenesis of this disease. Thirty patients with clinical symptoms of vulvovaginal candidiasis (15 positive vaginal culture to *C. albicans*, 11 negative culture and 4 positive culture to non-*C. albicans*) and 12 asymptomatic control women were selected. Serum and vaginal wash samples were obtained for the detection of anti-*C. albicans* antibodies by ELISA. The results showed that symptomatic patients with positive culture showed significantly higher levels of specific IgA in vaginal washes and lower in serum than those with negative culture. Specific serum IgE levels were very low compared to vaginal IgE. High levels of total specific IgG were found in serum and vaginal washes in both groups, regardless the fungal presence or absence. Specific IgG1 e IgG4 levels were significantly higher only in vaginal washes from symptomatic patients with positive culture, with a slightly higher IgG1/IgG4 ratio, indicating that the IgG1 antibody response may be predominantly involved in the fungal clearance. Our results indicate a pronounced antibody response of IgA, IgG1 and IgG4 to *C. albicans* in vaginal washes in symptomatic patients with positive culture, suggesting a important role of these antibodies in the local immune response triggered by the presence of the fungus.

1-INTRODUÇÃO

1.1-FUNGOS E *C. albicans*

Fungos são organismos ubiqüitários no meio ambiente, desencadeando doença no ser humano quando ele se encontra com sua imunidade alterada, como no uso de corticoesteróides, na AIDS, na gravidez, ou em casos de uso de antibióticos que alteram a microbiota normal, se tratando então de um oportunista (MURPHY *et al.*, 1998).

São eucariontes, heterotróficos, geralmente constituído por um aglomerado de células e crescem em determinados meios de cultura formando colônias. Durante muito tempo foram considerados vegetais e somente à partir de 1969 passaram a ser classificados em um reino à parte (LACAZ *et al.*, 1998).

Fungos de importância médica geralmente crescem entre 20° e 30°C, apresentando dimorfismo, com crescimento micelial- conjunto de hifas, entre 22° e 28°C e leveduriforme entre 35° e 37°C. Em *Cândida* a forma anfíbio infectante é a leveduriforme e a forma parasitária, isolada dos tecidos é a micelial. Essas formas são reversíveis (WARREN *et al.*, 1999).

Os fungos podem ser identificados através de exame direto pela microscopia, com a adição de KOH a 20% ou através de coloração como Gram, Giemsa ou tinta da Índia, onde devem ser observados: forma e tamanho, modo de fixação à célula, presença ou ausência de cápsula, espessura da parede celular, presença ou ausência de pseudo-hifas e presença de artroconídias- fragmentação das hifas. Podem ainda ser utilizados: imunofluorescência direta, biópsia e coloração, cultura com meio Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, pesquisa de antígenos circulantes- ácidos orgânicos por

cromatografia gasosa, testes intradérmicos e pesquisa de anticorpos séricos (WARREN *et al.*, 1999).

Para sua classificação são utilizadas características macroscópicas, microscópicas, formação de ascósporos- esporos sexuados localizados internamente aos ascos que são estruturas em formato de saco, testes de germinação em tubo, teste de fenol oxidase e urease, testes de assimilação de carboidratos, teste de assimilação de nitrato e fermentação de carboidratos (WARREN *et al.*, 1999).

Os Deuteromicetos, fungos que não apresentam reprodução sexuada, são os fungos mais comumente patogênicos (WARREN *et al.*, 1999).

Fungos do gênero *Candida* são fungos Deuteromicetos, reino *Fungi*, divisão *Deuteromycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Deuteromycetes*, ordem *Cryptococcales*, família *Cryptococcaceae*, gênero *Candida*, heterogêneos em suas características morfo-funcionais, englobando aproximadamente duzentas espécies (LUNA, 1997). Atualmente, devido aos avanços tecnológicos, este número ainda não está definido. Estão presentes no trato gastrointestinal, respiratório e genitourinário da espécie humana (LUNA, 1997).

Para sua identificação podem ser utilizadas exame direto pela microscopia com KOH a 20%, microscopia de luz em material corado por Hematoxilina-Eosina, Ácido Periódico de Schiff (PAS), cultura em meio Ágar Sabouraud glicose, onde desenvolvem colônias cremosas, formadas por elementos leveduriformes ovais ou arredondados (pseudo hifas podem se desenvolver), formação de tubo germinativo em soro ou albumina após incubação a 37°C após 2 horas. Suas espécies apresentam diferente assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio e de fermentação de açúcares (WARREN *et al.*, 1999).

Todas as áreas do trato gastrointestinal podem ser habitadas, com uma prevalência provavelmente subestimada de 80% (LUNA, 1997).

A espécie mais comumente encontrada é *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Infecções mistas podem ocorrer, sendo utilizados métodos laboratoriais para sua diferenciação como o CHROMagar. Podem ainda ser utilizadas: técnicas de imunoperoxidase, imunocitoquímica com anticorpos policlonais e monoclonais e técnicas moleculares como hibridização de ácido nucleico e amplificação de DNA pela reação de polimerase em cadeia- PCR (WARREN *et al.*, 1999).

C. albicans é a espécie mais patogênica devido ao maior número de fatores de virulência que possui: rápida germinação se semeado em meio com tecidos derivados do sangue, produção de protease, moléculas de superfície semelhantes à integrinas para adesão à matriz proteica extracelular, receptor para o complemento, variação de superfície e hidrofobia. Estes fatores foram recentemente revisados (WARREN *et al.*, 1999).

1.2-RESPOSTA IMUNE AOS FUNGOS

Muito pouco se sabe a respeito da imunologia dos fungos. Haveria a participação de barreiras mecânicas como a temperatura corporal, as mucosas ciliadas, fatores químicos como os ácidos graxos da pele, a microbiota normal de cada região, células inflamatórias, imunidade humoral e celular contra os fungos. Acredita-se que seja semelhante à resposta imune às bactérias, ou seja, predominantemente celular (MURPHY *et al.*, 1998).

Como estruturas antigênicas os fungos apresentam manoproteínas, glucanas, quitina, proteinases (enolases, zimolases, aldolases, fosfoglicerato quinases, álcool

desidrogenase, piruvato quinases) entre outras, contribuindo para o aumento de sua patogeneze (SWOBODA *et al.* 1993; SAVOLAINEN, 1995).

A maioria dos indivíduos desenvolve defesas imunológicas que impedem sua proliferação e progressão para o desenvolvimento de doenças. Esta defesa imunológica é primeiramente, se não inteiramente, mediada por células: macrófagos e linfócitos T. Os fungos crescem rapidamente pela porta de entrada e a resposta imune os debela em uma a duas semanas. A maioria dos seres humanos possui anticorpos contra *Cândida* no soro e nas mucosas. Alguns fatores solúveis estão relacionados com sua proliferação – Prostaglandina E2 via AMP-C e beta endorfina, enquanto o interferon gama participa na inibição de sua proliferação (ABBAS *et al.*, 2002).

Para *Cândida* foi descrita uma molécula integrina semelhante à CR3 (receptor 3 do complemento) em sua superfície e que está envolvida em sua mudança de morfologia, representando um fator de virulência, facilitando sua aderência às células. Não é somente uma molécula funcional mas também antigênica e estruturalmente relacionada a CR3. Isto aumenta a produção de proteinase e supressão de fagocitose pelos polimorfonucleares (SNAPER *et al.*, 1999).

Anticorpos são imunoglobulinas, moléculas com a função de neutralização e eliminação de microorganismos infecciosos e toxinas microbianas. Para exercer suas funções, interagem com outros mecanismos efetores como a imunidade celular e o sistema do complemento.

São produzidos por linfócitos B e plasmócitos e têm várias formas de atuação: opsonização de antígenos para promover a fagocitose, ativação do sistema de complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, degranulação de mastócitos, neutralização dos micróbios e toxinas microbianas (ABBAS *et al.*, 2002).

Estão divididos em classes: IgA, IgE, IgD, IgM e IgG e algumas subclasses já estão sendo estudadas: IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (ABBAS *et al.*, 2002). Estas subclasses têm diferentes funções, como por exemplo a fixação do complemento, em especial IgG1 e IgG3. Antígenos solúveis estimulam predominantemente a produção de IgG2, vírus estimulam preferencialmente a produção de IgG3, nematódeos estimulam a produção de IgG4 e a imunização repetida especialmente com alérgenos indutores de produção de IgE induzem a produção de IgG4. Elas subclasses têm papel redundante, ou seja, várias subclasses podem exercer o mesmo papel contra os antígenos (SNAPER *et al.*, 1999).

A resposta via linfócitos T helper 1 estimularia preferencialmente uma produção aumentada de anticorpos IgG1, indicando predominância da resposta imune celular, enquanto uma resposta via linfócitos T helper 2 promoveria uma produção predominante de anticorpos IgG 4, indicando preferencialmente uma resposta imune humoral (ABBAS *et al.*, 2002).

1.3-ECOSSISTEMA VAGINAL

O ecossistema vaginal é formado pelo nicho: epitélio vaginal e microbiota colonizadora.

1.3.1—EPITÉLIO VAGINAL

O conhecimento da anatomia microscópica da vagina humana é derivado principalmente de estudos realizados por BURGOS e colaboradores em 1978. Seu epitélio é formado por cinco camadas distintas, começando pelo lume sendo denominadas

superficial, de transição e intermediária, cada uma sendo composta de aproximadamente 10 camadas de células epiteliais escamosas. Abaixo destas estão as camadas parabasal e basal contendo uma a duas camadas de células epiteliais colunares. A membrana basal (lâmina basal) sustenta o epitélio basal.

Atravessando o epitélio vaginal está um sistema de canais intercelulares, por onde transitam macromoléculas, secreções e células da lâmina basal para o lume vaginal e no sentido lume- membrana basal. A lâmina basal vaginal humana contém macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células de Langerhans, eosinófilos, mastócitos e raramente neutrófilos. Estas células podem migrar também através dos canais interepiteliais. Nas mulheres sem evidência de infecção vaginal ou inflamação, a maior concentração de linfócitos se encontra nas camadas basal, parabasal e intermediária.

O epitélio vaginal, canais interepiteliais e a concentração de células linfóides são influenciados pelo ciclo menstrual. O número de mitoses nas camadas basal e parabasal é máximo durante a fase estrogênica do ciclo resultando em espessamento do epitélio. Na fase progestacional se observa dilatação de canais intercelulares durante a ovulação e na fase lútea, quando ocorre também aumento de plasmócitos na lâmina própria e aumento de linfócitos nos canais intercelulares.

Durante a menstruação ocorre o aparecimento inédito de células linfóides no lume vaginal de mulheres sadias, juntamente com macrófagos, granulócitos e linfócitos (HILL *et al.*, 1992).

A mucosa vaginal humana não contém glândulas nem epitélio secretor. Acredita-se que não exista resposta imune local mas a existência de plasmócitos e linfócitos produtores de IgG e IgA na lâmina basal, associado a um acessível caminho ao lume vaginal,

fortemente sugere que a vagina é capaz de promover uma resposta localizada por anticorpos (WITKIN, 1993).

Estudos mostraram que algumas proteínas colocadas na vagina humana podem ser detectadas 1-2 horas após na corrente sanguínea (ROSENZWEIG *et al.*, 1943).

A habilidade de penicilina, hormônios esteróides, prostaglandinas e do líquido seminal para serem absorvidas sistemicamente, quando presentes na vagina, são conhecidas há vários anos (AREF *et al.*, 1978).

A presença contínua no lume vaginal de antígenos de microorganismos, de líquido seminal, originados do meio ambiente; a habilidade destes antígenos de atravessar o epitélio vaginal; a presença de macrófagos e linfócitos T nos canais interepiteliais, sugere que uma resposta inflamatória subaguda frequentemente é induzida na mucosa vaginal.

A lâmina própria da mucosa vaginal humana também apresenta células de Langerhans, que possuem moléculas de classe dois do sistema principal de histocompatibilidade (HLA-DR), possuindo receptores para Fc de IgG e C3 do complemento (EDWARDS *et al.*, 1985). Elas têm a função de apresentar antígenos aos linfócitos T iniciando uma resposta imune específica. Elas também são encontradas nos canais interepiteliais (BURGOS *et al.*, 1978). Provavelmente elas transportam antígenos aos linfonodos regionais e servem como células apresentadoras de antígenos (APC) na vagina.

Os fatores que influenciam a concentração e ativação de células linfóides na vagina ainda são pouco conhecidos. A infecção por *Candida albicans* e outros patógenos resulta em acumulação de macrófagos, linfócitos e granulócitos no lume vaginal durante todos os estágios do ciclo menstrual (MARDH, 1991).

A IgG no fluido vaginal é principalmente um transudato do soro. Já a IgA é produzida principalmente no tracto genital (WITKIN, 1993).

Já foi demonstrado o acúmulo seletivo de determinadas substâncias no lume da vagina, e isto se deveria a um mecanismo de fluxo sanguíneo contracorrente no trato genital da mulher. Isto seria a explicação da ocorrência de vaginite alérgica induzida por cândida em mulheres susceptíveis, através deste acúmulo seletivo de alérgenos no lume vaginal, sua passagem através dos canais interepiteliais e ligação específica com IgE nos mastócitos da lâmina basal sub-epitelial (WITKIN, 1993).

1.3.2-MICROBIOTA COLONIZADORA

Com relação à microbiota vaginal considera-se como ecossistema consistindo de nicho ou habitat representado pelo epitélio vaginal e o biota do habitat representado pela microbiota colonizadora (HILL *et al.*, 1992) A microbiota consiste de uma grande variedade de espécies e as interações físicoquímicas ocorrem entre estas espécies e o tecido vaginal.

Um outro nível de interação ocorre quando microorganismos exógenos são introduzidos neste habitat e competem com os endógenos pela sobrevivência no epitélio, interagindo com o mesmo por mecanismos individuais (LARSEN, 1993).

Vários microorganismos associados com vulvovaginites frequentemente são isolados de mulheres assintomáticas, indicando não serem estes os únicos fatores da patogenia, devendo-se considerar as características de cada patógeno e do meio ambiente microbiológico que estão envolvidas (LARSEN, 1993).

As espécies e a densidade da população da microbiota é um reflexo das características físicas e químicas do tecido colonizado. Alterações nas condições do tecido promovem uma alteração nesta microbiota (LARSEN, 1993).

A microbiota vaginal é formada por gram positivos, gram negativos anaeróbios e anaeróbios facultativos, entre outras. A interação desta microbiota com os microorganismos exógenos pode ser antagonista ou sinergista, tendo papel relevante na vaginites (LARSEN, 1985). A microbiota normal vaginal contém microorganismos que impedem a proliferação da *Cândida*.

O ácido láctico produzido pelos lactobacilos restringe o crescimento de outros microorganismos por produzir um pH ácido na vagina, favorecendo a colonização pelos anaeróbios. Estes lactobacilos tem sua colonização dependente dos efeitos estrogênicos, que atuaria aumentando a deposição de glicogênio no epitélio vaginal, promovendo substrato para seu crescimento (WEINSTEIN *et al.*, 1939). Produzem ácidos através da fermentação do glicogênio, reduzindo o pH vaginal (4-4,5) e restringindo a flora a espécies tolerantes a este pH baixo. Este pH baixo atuaria alterando a solubilidade de micronutrientes e a função de determinadas enzimas destes microorganismos. Acredita-se que o peróxido de hidrogênio tenha um papel importante como produto de alguns lactobacilos (ESCHENBACH *et al.*, 1989).

Alguns autores citam que nem todos os lactobacilos atuam desta forma, a acidez vaginal poderia ser mantida sem sua presença (WEINSTEIN *et al.*, 1938, 1939).

A presença de Bacteróides na fase proliferativa do ciclo menstrual é de 35% e na fase secretora é de 27%, sugerindo também efeitos da progesterona (THADEPALLI *et al.*, 1982).

Os metabólitos produzidos pelos microorganismos endógenos agem sinergicamente promovendo proteção às hospedeiras e esta interação estaria em um equilíbrio dinâmico que pode se alterar de acordo com alterações nos fatores deste equilíbrio.

O papel do conteúdo das secreções presentes na vagina(aminoácidos, carboidratos e proteínas) é fundamental no crescimento destes microorganismos. As pacientes normais apresentam uma quantidade maior de carboidratos, de proteínas e de aminoácidos do que as pacientes com candidíase vaginal (LARSEN, 1993).

Alguns micronutrientes como vitaminas e ferro parecem ter papel importante no crescimento dos microorganismos desta flora. O ferro por exemplo incorporado a algumas enzimas aumentam a virulência de vários microorganismos, e alguns deles produzem ligantes de transferrina de ambientes pobres em ferro, retirando o ferro da transferrina da hospedeira. Foi observado o aumento na prevalência de algumas bactérias durante a menstruação (LARSEN, 1982).

Esta microbiota se encontra em um equilíbrio dinâmico e com uma composição restrita e estável, sendo demonstrado em experimentos em pacientes com utilização de gluconato de clorexidina ou povidone iodine aplicados na vagina, quando a flora volta à sua normalidade em 7 dias no caso do primeiro e em 24 horas no caso do segundo (MONIF *et al.*, 1980).

O uso prolongado de antibióticos parenterais determina alterações nesta flora com um aumento por exemplo de *Pseudomonas* e *Enterococos* (OHM *et al.*, 1975, 1976). Isto não foi observado com relação ao uso de antibióticos por tempo curto ou na profilaxia (GROSSMAN *et al.*, 1979). Uma das sequelas deste uso prolongado de antibióticos é a candidíase vaginal (LARSEN, 1993).

A microbiota normal da vagina possui estruturas que promovem sua aderência ao epitélio. O primeiro passo que o patógeno desenvolve é a aderência ao epitélio vaginal susceptível, as bactéria utilizando para tal seus pilos ou outras estruturas (STROMBERG *et al.*, 1988). *Candida albicans* também tem esta habilidade de adesão, porém algumas pacientes apresentam receptores apropriados para sua adesão e nem todas células epiteliais apresentam estes receptores. Estes receptores são em sua maioria formados por carboidratos complexos (TOSH *et al.*, 1992; GUSTAFSON *et al.*, 1991).

Uma outra característica dos patógenos é a produção de produtos tóxicos à hospedeira, como produtos do metabolismo final ou toxinas macromoleculares, com ações específicas sobre determinadas células vaginais. No entanto, se *Candida albicans* elabora alguma toxina, deverá produzir em quantidade suficiente para produzir sintomas somente se houver sua proliferação devida a algum desequilíbrio de microecossistema. Isto ocorre por exemplo quando o uso de antibióticos altera a microbiota normal da vagina (LARSEN, 1993).

Candida albicans produz uma micotoxina com estrutura química epipolítiodioxopiperazina que teria ação antibacteriana e imunossupressora que é uma gliotoxina (SHAH *et al.*, 1992). Esta micotoxina somente está presente nas pacientes sintomáticas. Ela atua interferindo na viabilidade e função dos leucócitos humanos, como por exemplo na produção de ânions superóxido, fagocitose, quimiotaxia e lise de bactérias.

Existe uma interação entre os microorganismos presentes na microbiota vaginal, com o produto de uns inibindo ou estimulando o crescimento dos outros. Os fatores que favorecem o crescimento dos lactobacilos, por exemplo, também favorecem o crescimento de *Candida albicans*.

1.4-CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Candidíase vulvovaginal é uma patologia ginecológica freqüente, estimando-se que a maioria das mulheres (75%) irá apresentar ao menos um episódio da infecção no decorrer de sua vida e 40% terão um segundo episódio (HURLEY, 1981). Algumas mulheres (3-5%) irão apresentar candidíase vulvovaginal recorrente, que se caracteriza pela apresentação de 4 episódios em um ano (CLANCY, 1999). O uso de anticoncepcionais orais, antibióticos e as várias formas de imunodeficiências podem estar envolvidos no desencadeamento destes episódios de infecção de repetição (KIRKPATRICK, 1984).

É a infecção por *Cândida* mais comum em mulheres e através do mundo é a vulvovaginite mais comum nos países de clima tropical. Hoje não é mais considerada uma doença sexualmente transmissível.

Está relacionada com o diabetes, a gravidez, o uso de duchas vaginais, vestuário inadequado, principalmente roupas sintéticas, e fatores climáticos como o verão.

Clinicamente se apresenta como um corrimento branco semelhante à nata de leite, espesso, em placas, prurido vulvar intenso, vermelhidão e ardência da genitália. Esses sintomas pioram no período pré-menstrual (MORTOZA, 2000).

As investigações sobre sua imunopatogênese também incluem a pesquisa do papel dos anticorpos. Sabe-se que a resposta imune contra os fungos é predominantemente celular, mas os anticorpos participariam como uma barreira ajudando na defesa contra o fungo.

Alguns trabalhos têm mostrado as classes de anticorpos correlacionadas à infecção bem como os seus níveis tanto no soro quanto no fluido vaginal (WARNOCK, 1978; GOUGH, 1984; ROMERO-PIFFIGER, 1985; BURGESS, 1986; WITKIN, 1988; ISHIGURO *et al.*, 1992; BOHLER, 1994; MORAES, 1995).

Como ainda é escassa a literatura nesta área, decidimos desenvolver este estudo com a finalidade de tentar esclarecer mais a respeito do papel da resposta imune anticórpica sistêmica e localizada nesta infecção que é muito comum e extremamente incômoda para as mulheres.

2-OBJETIVOS

- Determinar os níveis de anticorpos IgA, IgE, IgG e subclasses (IgG1 e IgG4) específicas a *C. albicans* no soro e lavado vaginal de mulheres com e sem candidíase vulvovaginal.
- Avaliar o papel dos diferentes isotipos de anticorpos anti-*C. albicans* nos mecanismos imunopatológicos da doença.

3-PACIENTES E MÉTODOS:

3.1-PACIENTES

Foram selecionadas 30 pacientes com sintomas de candidíase vulvovaginal (prurido vulvar e ardência) e sinais clínicos como secreção e/ou hiperemia vulvovaginal (grupo I) na faixa etária de 18 a 36 anos atendidas no Ambulatório de Alergia e Ginecologia da Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de março de 2001 a outubro de 2001. Doze mulheres assintomáticas, com a mesma faixa etária (grupo II) foram selecionadas dentre as pacientes que estavam realizando exames colpocitológicos de rotina para prevenção do câncer de colo uterino. Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU envolvendo seres humanos e um termo de consentimento foi obtido de todas as pacientes.

O diagnóstico definitivo de candidíase vulvovaginal foi realizado por meio de história e exames clínicos e laboratoriais para identificação de *Candida albicans*.

3.2-SECREÇÃO VAGINAL

3.2.1-SWABS DE SECREÇÃO VAGINAL

Swabs de secreção vaginal foram obtidos e encaminhados ao Laboratório Central de Análises Clínicas da UFU para análise através de pesquisa direta por microscopia (pseudo-hifas e leveduras) usando hidróxido de potássio (KOH) 20%, cultura em meio de Ágar-Sabouraud, CHROMagar (formação de colônias verde-azuladas), teste de uréia (urease negativa), visualização de formação de tubo germinativo por microscopia (coloca-

se pequena quantidade de fungo retirado do Ágar Sabouraud em 0,5 ml de soro e deixa em estufa a 35-37°C por 3 horas, lê-se a formação de tubo germinativo sem constricção na base) e Caldo Sabouraud hipertônico (NaCl a 6,5%, deixa em 30°C por 96 horas onde há crescimento). Foi realizado também exame de Papanicolau para auxílio no diagnóstico.

3.2.2-AMOSTRAS DE LAVADO VAGINAL

Amostras de lavado vaginal foram obtidas por meio da instilação de 5 mL de soro fisiológico estéril no fundo de saco vaginal e subsequente aspiração com a mesma seringa. As amostras foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Imunologia da UFU, centrifugadas a 3645g (4500 rpm) a 4°C por 15 min e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C até a realização dos ensaios para a detecção de anticorpos específicos a *C. albicans*.

3.3-AMOSTRAS DE SORO

Amostras de sangue foram obtidas por meio de venopuntura concomitantemente às amostras de lavado vaginal. Após centrifugação a 1125g (2500 rpm) por 10 minutos à temperatura ambiente, os soros obtidos foram aliquotados e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.4-TESTES IMUNOENZIMÁTICOS

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para a determinação dos níveis de anticorpos (IgA, IgE, IgG, IgG1 e IgG4) específicos a *C. albicans* nas amostras

de soro e lavado vaginal de pacientes e controles, segundo Silva *et al.* (2001), com modificações. Em resumo, microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com extrato antigênico de *C. albicans* (Bayer Corporation, USA) a 1:20 em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 durante 18 h a 4 °C. Placas foram lavadas com PBS (salina tamponada com fosfatos) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescida de BSA (soroalbumina bovina) a 1% (PBS-T-BSA) por 1h a temperatura ambiente (TA). Etapas subsequentes foram realizadas utilizando PBS-T-BSA como diluente e lavagens com PBS-T foram feitas entre as etapas da reação. As placas foram incubadas com amostras de soro a 1:2 (IgE), 1:5 (IgG4), 1:10 (IgA, IgG, IgG1,) e lavado vaginal não diluído (IgE) e 1:2 (IgA, IgG, IgG1, IgG4), em duplicata, durante 1 h (IgA, IgG e subclasses) ou 2 h (IgE) a 37 °C. Em paralelo, como controle negativo dos soros e amostras de lavado vaginal, somente diluente (PBS-T-BSA) foi utilizado para todas as classes de anticorpos. Subsequentemente, anticorpos secundários respectivos foram adicionados como anti-IgE humana biotinizada (1:250; Kirkegaard & Perry Laboratories, USA), anti-IgA e anti-IgG humanas marcadas com peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., USA) e anticorpos monoclonais anti-IgG1 (1:500; Sigma) ou anti-IgG4 humanas (1:200; Sigma) por 1 h a 37 °C. Finalmente, conjugado estreptavidina-peroxidase (1:250; Sigma) foi adicionado nas placas com anticorpo secundário biotinizado e anti-IgG de camundongo-peroxidase (1:500; Sigma) para os anticorpos monoclonais, incubando-se por 30 min a TA. A reação foi desenvolvida pela adição de substrato enzimático (ABTS 0,01M e H₂O₂ a 0,03%) e os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 405 nm. Os resultados foram expressos em Unidades de Reatividade ELISA (UE) e calculados pela fórmula, UE = DO

líquida (DO da amostra – DO do controle negativo) X fator de diluição, como proposto por Yi e colaboradores (2002).

3.5-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística consistiu de determinações de média aritmética e desvio padrão dos níveis de anticorpos (UE) específicos a *C. albicans* e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste *t* de Student. Diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

3.6- NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Os procedimentos realizados em todas as etapas, coleta de material no ambulatório de ginecologia, realização dos experimentos no Laboratório de Análises Clínicas e a realização dos experimentos no Laboratório de Imunologia, seguiram as normas de biossegurança (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

3.7- RETORNO ÀS PACIENTES

Todas as pacientes foram informadas à respeito dos resultados dos exames e dos experimentos, bem como receberam informações à respeito de suas alterações e do tratamento quando necessário.

4-RESULTADOS

Dentre as 30 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal, 15 (50%) apresentaram positividade para *C. albicans* em cultura de secreção vaginal, 11 (36,7%) foram negativas e 4 (13,3%) foram positivas para outras espécies de *Candida*. Entre as 12 mulheres controles, 9 (75%) apresentaram cultura negativa enquanto 3 (25%) foram positivas para *C. albicans*. Devido ao reduzido número de mulheres controles com cultura positiva, este subgrupo foi excluído para análises estatísticas. Também foi excluído o grupo que apresentou outras espécies de *Candida*.

4.1-RESPOSTA DE ANTICORPOS IgA ANTI-*C. albicans*

Respostas de anticorpos IgA anti-*C. albicans* em amostras de soro e lavado vaginal de pacientes (grupo I) e controles (grupo II) com cultura vaginal positiva (cultura +) ou negativa (cultura -) estão demonstradas na figura 1. Pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (grupo I) com cultura positiva apresentaram níveis médios de IgA anti-*C. albicans* em amostras de soro significativamente menores do que aquelas com cultura negativa (5,83 UE *versus* 7,55 UE; $p = 0,0453$). Por outro lado, em amostras de lavado vaginal, níveis de IgA específica foram significativamente maiores em pacientes com cultura positiva (1,19 UE *versus* 0,51 UE; $p = 0,0422$).

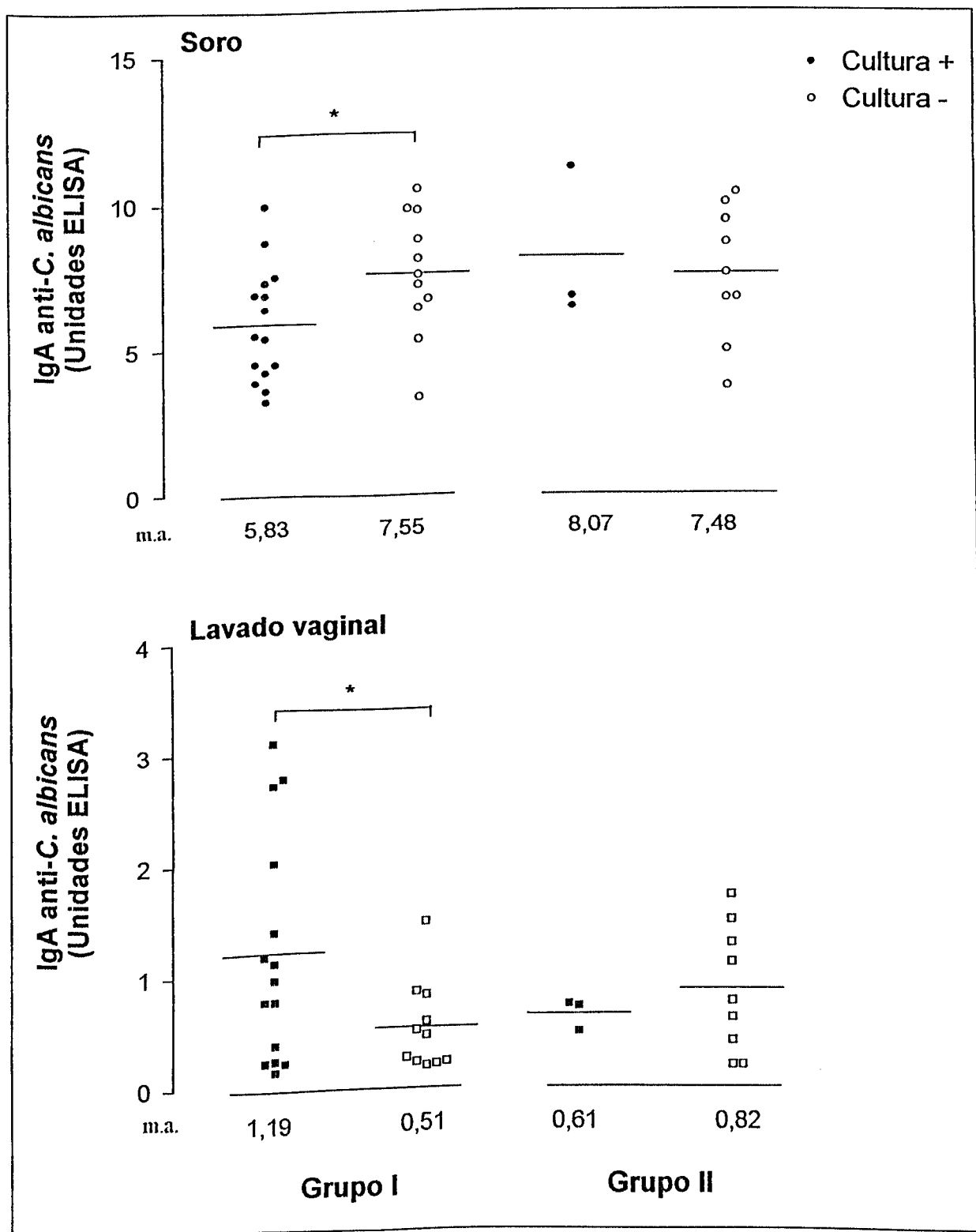


Figura 1. Níveis de anticorpos IgA anti-*C.albicans*, expressos em Unidades de Reatividade ELISA, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II), de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. As barras horizontais indicam as médias aritméticas (m.a.) para cada grupo.

4.2- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgE ANTI-*C. albicans*

Em relação aos anticorpos IgE anti-*C. albicans*, níveis séricos de IgE específica foram extremamente baixos em relação aos valores encontrados no lavado vaginal, embora diferenças significativas foram encontradas apenas em amostras de soro do grupo I com cultura positiva (0,19 UE *versus* 0,16 UE; $p = 0,0121$). Estes resultados estão demonstrados na figura 2.

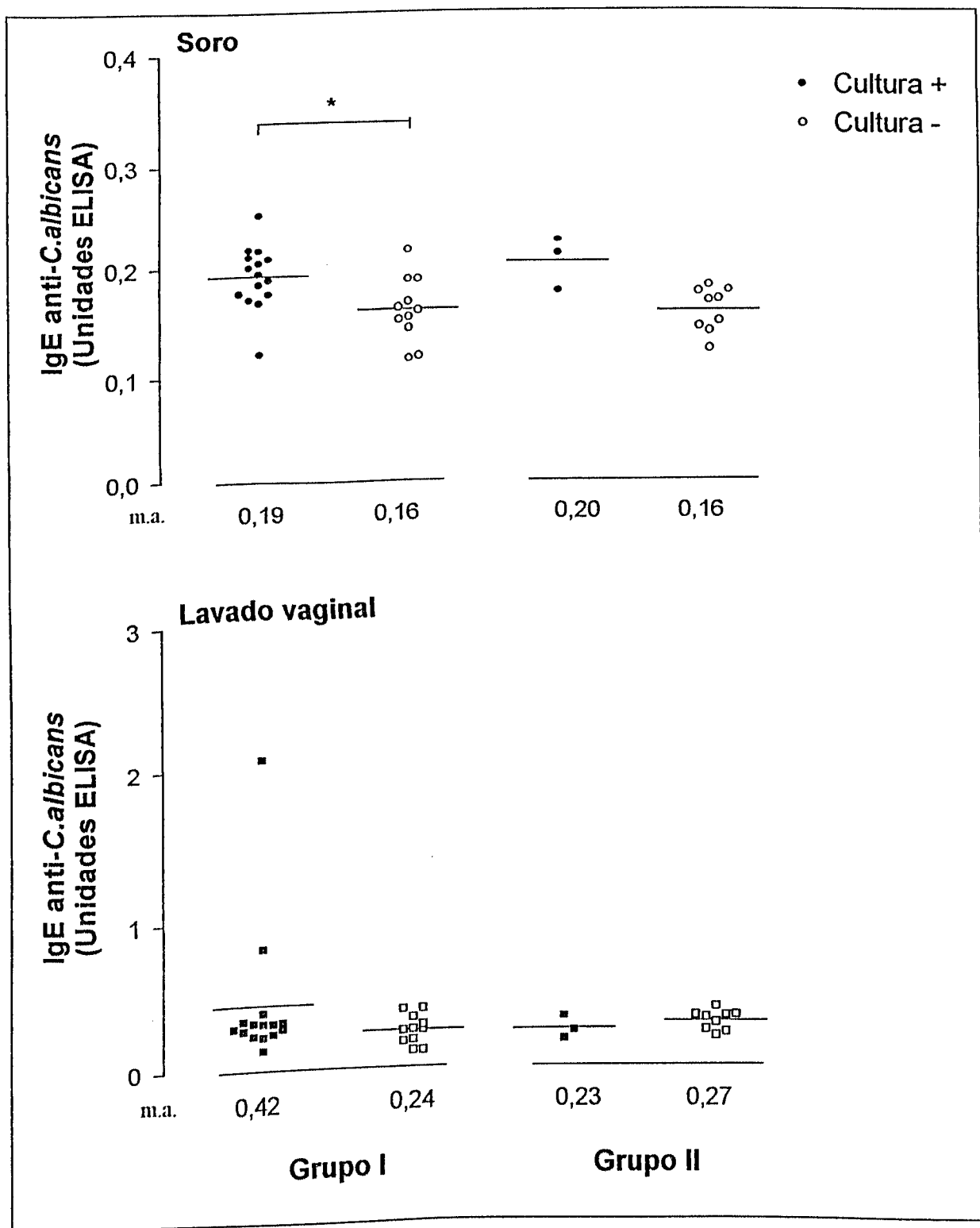


Figura 2. Níveis de anticorpos IgE anti-*C.albicans*, expressos em Unidades de Reatividade ELISA, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II), de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. As barras horizontais indicam as médias aritméticas (m.a.) para cada grupo.

4.3- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*C. albicans*

A resposta anticórpica de IgG total anti-*C.albicans* está ilustrada na figura 3. Níveis de IgG total específica em amostras de soro e lavado vaginal não apresentaram diferenças significativas tanto em pacientes como em mulheres controles, independentemente dos resultados de cultura vaginal.

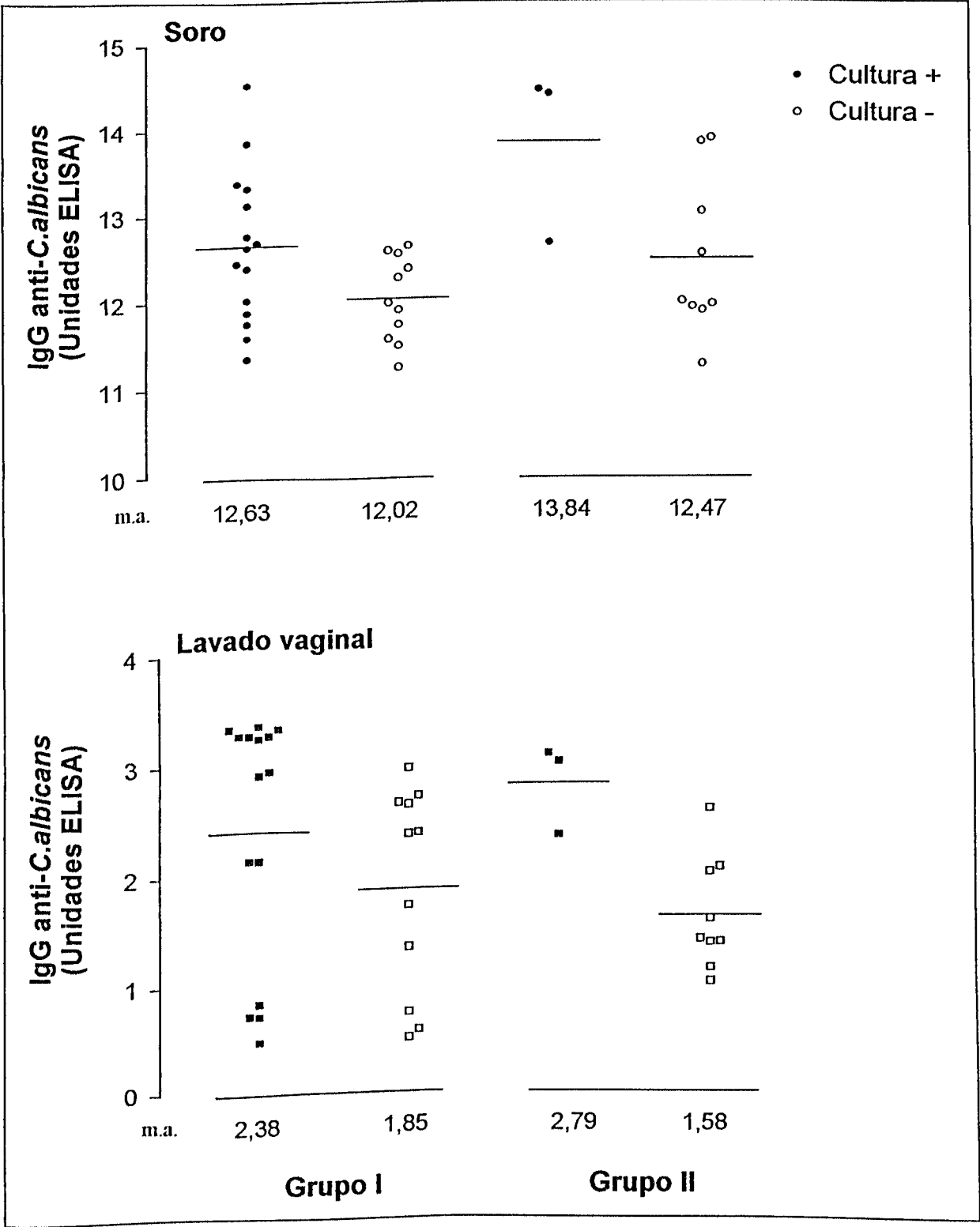


Figura 3. Níveis de anticorpos IgG e suas sub-classes IgG1 e IgG4 anti-*C.albicans*, expressos em Unidades de Reatividade ELISA, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II) de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. As barras horizontais indicam as médias aritméticas (m.a.) para cada grupo.

4.4- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG1 ANTI-*C. albicans*

Níveis séricos de IgG1 específicas não mostraram diferenças significativas entre os grupos e respectivos subgrupos. Entretanto, em amostras de lavado vaginal, os níveis de IgG1 anti-*C. albicans* foram significativamente maiores em pacientes com sintomas clínicos e cultura vaginal positiva que aquelas com cultura negativa (1,65 UE *versus* 0,20 UE; $p = 0,0016$) (Figura 4).

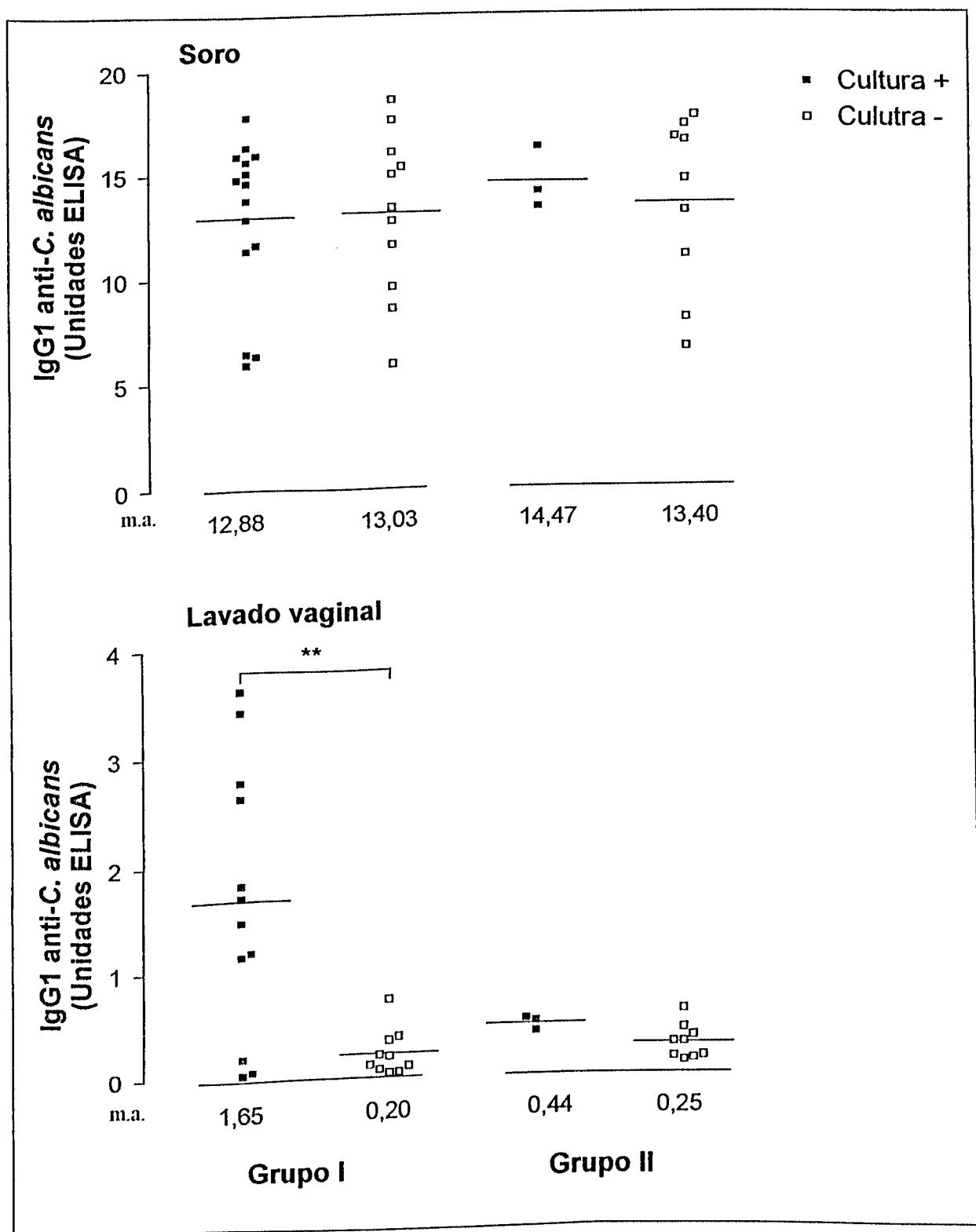


Figura 4. Níveis de anticorpos IgG1 anti-*C.albicans*, expressos em Unidades de Reatividade ELISA, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II) de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. As barras horizontais indicam as médias aritméticas (m.a.) para cada grupo.

4.5- RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG4 ANTI-*C. albicans*

Similarmente, níveis séricos de IgG1 específicas não mostraram diferenças significativas entre os grupos e respectivos subgrupos. Entretanto, em amostras de lavado vaginal, os níveis de IgG4 anti-*C. albicans* foram significativamente maiores em pacientes com sintomas clínicos e cultura vaginal positiva que aquelas com cultura negativa (0,60 UE *versus* 0,20 UE; $p = 0,0082$) (Figura 5).

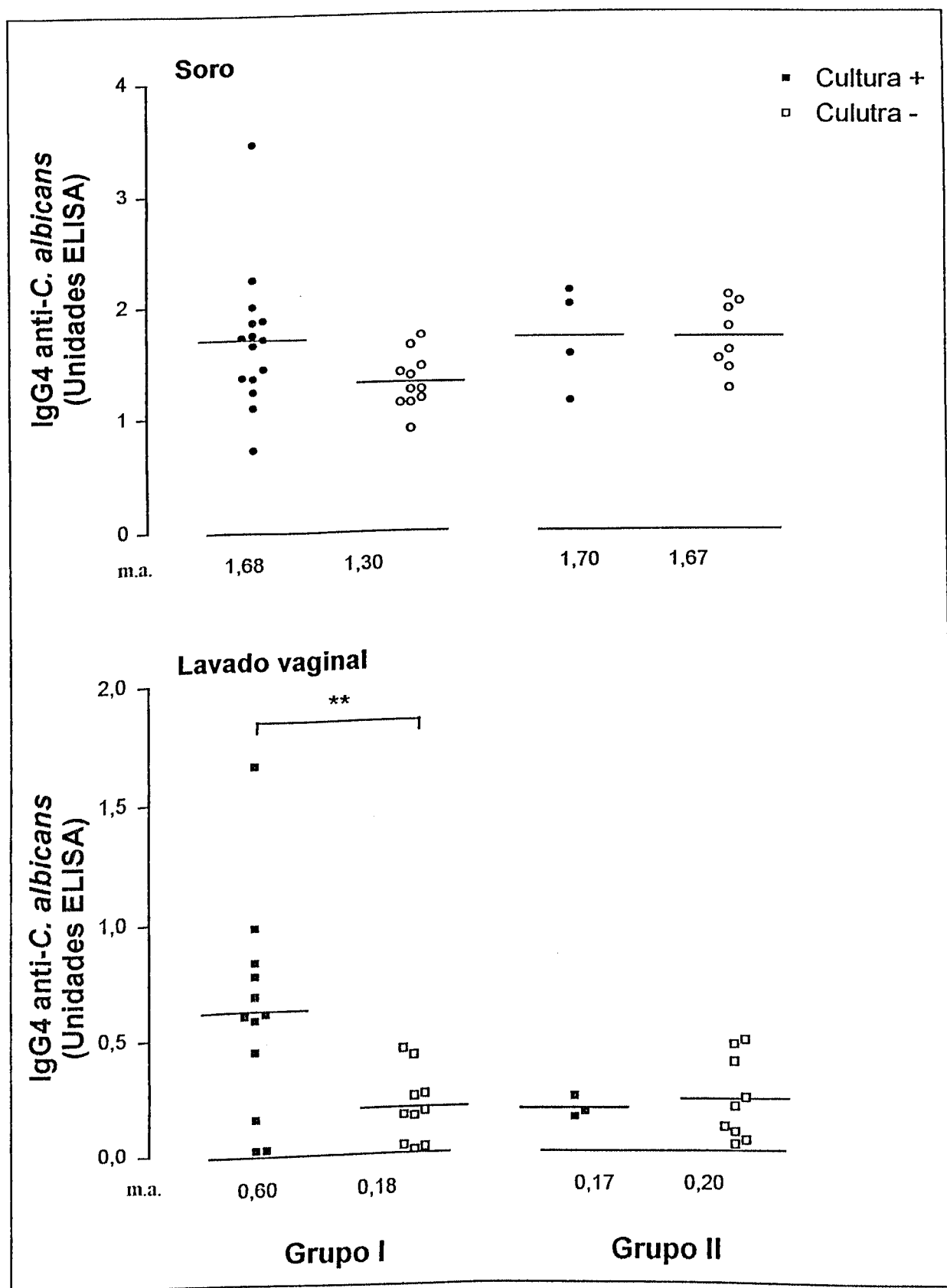


Figura 5. Níveis de anticorpos IgG4 anti-*C.albicans*, expressos em Unidades de Reatividade ELISA, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II) de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. As barras horizontais indicam as médias aritméticas (m.a.) para cada grupo.

4.6- RELAÇÃO IgG1/IgG4

A figura 6 demonstra a relação IgG1/IgG4 específica a *C. albicans* em amostras de soro e lavado vaginal de ambos os grupos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para as amostras de soro, porém em amostras de lavado vaginal, observou-se uma tendência (no limite de significância) para uma relação IgG1/IgG4 aumentada no grupo de pacientes com sintomas clínicos e cultura positiva em comparação àquelas com cultura negativa (2,90 UE *versus* 1,65 UE; $p = 0,0558$).

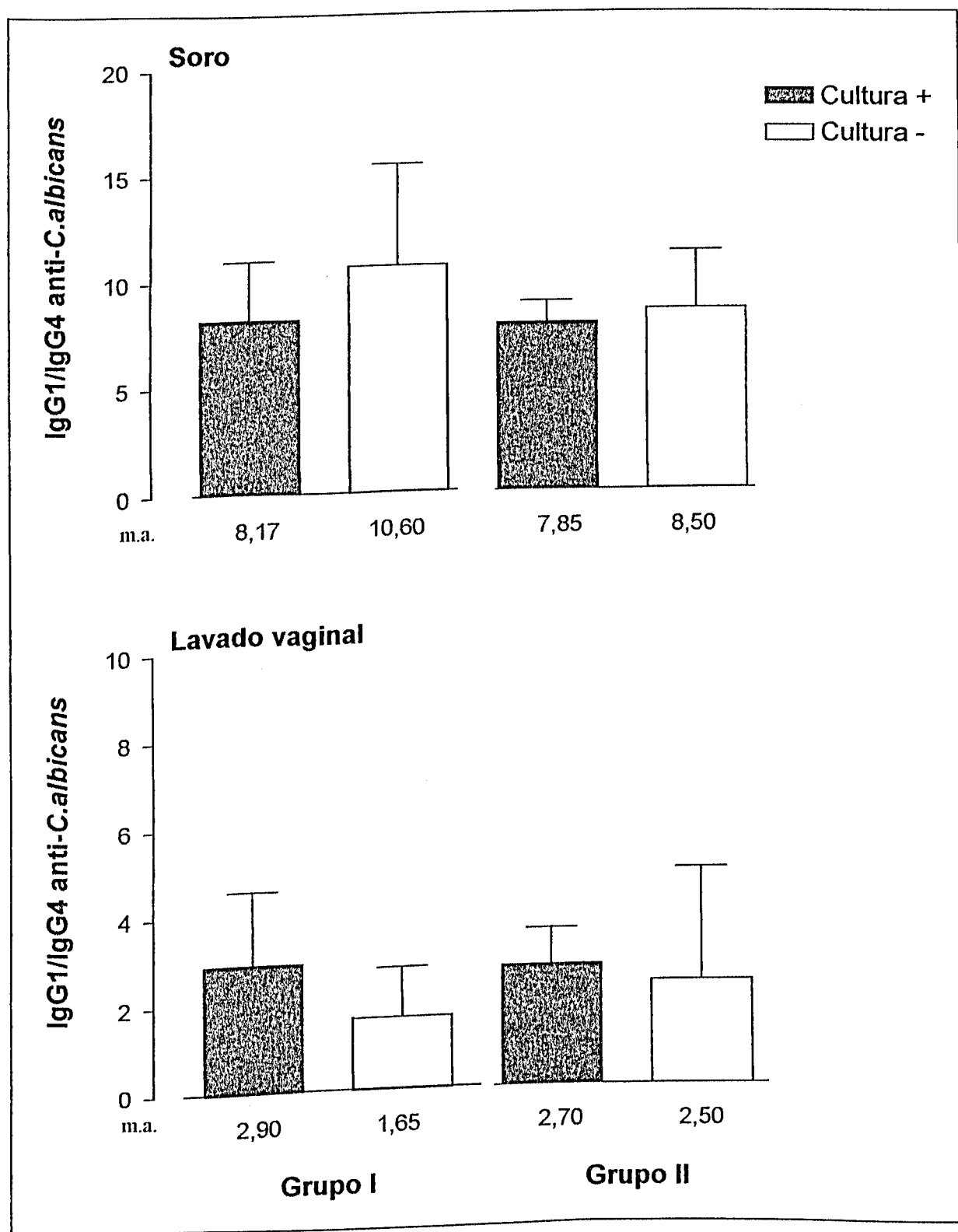


Figura 6. Relação dos níveis de IgG1/IgG4 anti-*C.albicans*, em amostras de soro e lavado vaginal de 26 pacientes com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal (Grupo I) e de 12 mulheres sem sintomas clínicos (controles; Grupo II), de acordo com resultado da cultura de secreção vaginal a *C.albicans*. m.a.: média aritmética.

5-DISCUSSÃO

Dados da literatura têm mostrado que 85-90% dos fungos isolados de secreção vaginal são identificados como *Candida albicans*. Entretanto, porcentagens crescentes de infecções por outras espécies de *Candida* têm sido relatadas. Muitas mulheres são portadoras assintomáticas de *C. albicans* quando em baixo número. Estas observações são compatíveis com o conceito de que *C. albicans* é considerada como um comensal ou patógeno vaginal, indicando que as alterações no ambiente vaginal do hospedeiro são necessárias para induzir os seus efeitos patológicos ou estar associado com sintomas (SOBEL, 1993).

Entre os fatores predisponentes à candidíase vulvovaginal, destacam-se as condições que induzem imunodepressão, tais como a gravidez, o diabetes, o uso de corticosteróides e AIDS, ou o uso de antibióticos que alteram a microbiota normal vaginal. No presente estudo, tais fatores não foram avaliados, uma vez que foram considerados como critérios de exclusão na formação dos grupos. Desta forma, para análises comparativas, foram avaliadas pacientes sintomáticas (grupo I) com cultura de secreção vaginal positiva ou negativa para *C. albicans* e assintomáticas (grupo II) com cultura negativa.

A resposta vaginal de hipersensibilidade mediada por IgE a *C. albicans* pode ser um fator contribuinte à vaginite recorrente em um determinado grupo de mulheres susceptíveis (WITKIN *et al.*, 1988). A liberação de histamina e prostaglandina E2 induz uma resposta inflamatória e imunossupressão localizada, que favorece a proliferação de *C. albicans* e outros microrganismos oportunistas. Assim, estes autores demonstraram que cerca de 18% de pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente apresentaram IgE no

lavado vaginal e apenas 6% apresentaram IgE no soro, sugerindo uma resposta de hipersensibilidade imediata localizada. No presente trabalho, os níveis de anticorpos IgE no soro, mas não no lavado vaginal, foram discretamente maiores apenas no grupo I com cultura positiva. Estes resultados divergentes podem ser devido ao fato de que o nosso principal grupo de estudo compreendeu pacientes com sintomas clínicos de candidíase, mas não de forma recorrente.

Nossos resultados mostraram diferente resposta anticórpica de IgA anti-*C. albicans* dependendo do compartimento imunológico (soro e lavado vaginal) analisado em pacientes com sintomas clínicos de candidíase, indicando uma resposta local mais acentuada nas pacientes com cultura positiva, enquanto a resposta sistêmica está mais acentuada nas pacientes com cultura negativa. Isto poderia refletir que a síntese de anticorpos IgA associada à mucosas estaria sendo estimulada na vigência da infecção ativa ao passo que a resposta sistêmica (presença de IgA no soro) poderia refletir uma exposição anterior. Por outro lado, altos níveis de anticorpos IgG total anti-*C. albicans* foram encontrados tanto no soro como no lavado vaginal em ambos os grupos, independente da presença do fungo, indicando a exposição constante ao agente, refletindo na existência de memória imunológica. Estes dados são concordantes com os de Burges e colaboradores (1986), que encontraram IgG como classe de anticorpo predominante em pacientes com candidíase vulvovaginal. Entretanto, estudos anteriores não têm encontrado diferença significativa nos níveis de IgA específica como os de Bohler e colaboradores (1994) e Gough e colaboradores (1984), ou IgG específica como os de Gough e colaboradores (1984) no soro e/ou secreções vaginais de pacientes com ou sem candidíase.

Enquanto a resposta sistêmica e local de IgG total específica a *C. albicans* não apresentou diferença significativa entre os grupos, o perfil de resposta das subclasses de

IgG (IgG1 e IgG4) específica mostrou que ambas estão aumentadas no lavado vaginal de pacientes sintomáticas com cultura positiva quando comparadas com aquelas sintomáticas com cultura negativa, indicando um importante papel destas subclasses na resposta imune local estimulada pela presença do fungo, ao contrário do que foi observado na resposta sistêmica destas subclasses.

Analisando a relação IgG1/IgG4 específicas a *C. albicans* pôde-se notar nítida tendência de aumento dessa relação no grupo de pacientes com sintomas clínicos e cultura positiva comparativamente aquelas com cultura negativa, sugerindo que a resposta de IgG1 possa estar predominantemente envolvida para a resolução da infecção fúngica. Isto confirma a hipótese de que a resposta imune perante os fungos é predominantemente celular.

Esta investigação representa um dos primeiros estudos relacionados às subclasses de IgG específicas a *C. albicans* e estudos futuros deverão ser realizados para esclarecer o papel protetor ou imunopatológico das subclasses de IgG em pacientes portadores de candidíase vulvovaginal.

6-CONCLUSÕES

-Nossos resultados indicam resposta acentuada de anticorpos IgA, IgG1 e IgG4 anti-*C. albicans* no lavado vaginal de pacientes sintomáticas com cultura positiva, sugerindo um importante papel destes anticorpos na resposta imune local estimulada pela presença do fungo.

-Houve uma tendência do aumento da relação IgG1/IgG4 no lavado vaginal de pacientes sintomáticas com cultura positiva, sugerindo uma resposta localizada predominantemente T helper 1 envolvida na resolução da infecção fúngica.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Mecanismos efetores da imunidade humoral. In: **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, 4ª ed, p.309-316.

AREF, I.; EL-SHEIKHA, Z.; HAFEZ, E. S. E.. Absorption of drugs and hormones in the vagina. In: HAFEZ, E. S. E.; EVANS, E. T., eds. **The human vagina**. Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 179.

BOHLER, K.; KLADE, H.; REINTHALLER, A. Immunohistochemical study of in vivo and in vitro IgA coating of *Candida* species in vulvovaginal candidiasis. **Genitourinary Medicine**, v. 70, n. 3, p. 182-186, 1994.

BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I.N.; HARALDSEN, G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cell do not always home along the same track. **Immunology Today**, v. 20, n. 6, p. 267-276, 1999.

BURGES, G.; HOLLEY H.P.; VIRELLA JR., G. Immunoglobulin class of anti-*Candida* antibodies in patients with vaginal candidiasis. **Diagnostic Immunology**, v. 4, n. 1, p. 43-46, 1986.

BURGOS, M. H.; ROIG DE VARGAS-LINARES, C. E. Ultrastructure of the vaginal mucosa. In: HAFEZ, E. S. E.; EVANS, E. T., eds. **The human vagina**. Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 63.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**.
Uberlândia: EDUFU (Editora da UFU). 1997, 55p.

CLANCY, R.; CORRIGAN, E.; DUNKLEY M.; EYERS, F.; BEAGLEY, K. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis – Allergy or Immune Deficiency? **Internal Archives of Allergy and Immunology**, v. 118, p. 349-350, 1999.

EDWARDS, J. N.; MORRIS, H. B. Langerhan's cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 92, p. 9774, 1985.

ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S.J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C.M.; HOLMES, K.K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 251, 1989.

GOUGH, P. M.; WARNOCK, D.W.; RICHARDSON, M.D.; MANSELL, N.J.; KING, J.M. IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in the genital tract secretions of women with or without vaginal candidosis. **Sabouraudia**, v. 22, n. 4, p. 265-271, 1984.

GROSSMAN III, J. H.; ADAMS, R. L. Vaginal flora in women undergoing hysterectomy with antibiotic prophylaxis. **Obstetric and Gynecology**, v. 53, p. 23, 1979.

GUSTAFSON, K. S.; VERCELLOTTI, G. M.; BENDEL, C. M.; HOSTETTER, M. K. Molecular mimicry in *Candida albicans*: Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to the human endothelium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 1896, 1991.

HILL, J. A.; ANDERSON, D. J. Human vaginal leukocytes and effects of vaginal fluid on lymphocyte and macrophage defense functions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, p. 720, 1992.

HURLEY, R. Recurrent *Candida* infection. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 8, p. 209, 1981.

ISHIGURO, A.; HOMMA, M.; SUKAI, T.; HIGASHIDE, K.; TORII, S.; TANAKA, K. Immunoblotting analysis of sera from patients with candidal vaginitis and healthy females. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, suppl. 4, p. 281-292, 1992.

KIRKPATRICK, C. Host factors in defense against fungal infection. **American Journal of Medicine**, v. 71, p. 1-12, 1984.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Reino Fungi. In: **Guia para identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. São Paulo: SARVIER-FAPESP, 1998, p.1-52.

LARSEN, B. Vaginal flora in health and disease. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, n.1, p. 107-121, 1993.

LARSEN, B.; GALASK, R. P. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. **Annals of Internal Medicine**, v. 96, p. 926, 1983.

LARSEN, B.; MARKOVETZ A. J.; GALASK, R. P. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. **Annals of Internal Medicine**, v. 96, p. 926, 1982.

LUNA, M. A. Candidiasis. In: CONNOR, D. H.; CHANDLER, F. W., eds. **Pathology of Infectious Diseases**. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, v. II, p. 953-964, 1997.

MARDH, P. A. The vaginal ecosystem. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 1163, 1991.

MONIF, G. R. G.; THOMPSON, J. L.; STEPHENS, H. D.; BAER, H. Quantitative and qualitative effects of povidone-iodine liquid and gel on the aerobic and anaerobic flora of the female genital tract. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 137, p. 432, 1980.

MORAES, P. S. A. Estudo da associação entre candidíase vaginal de repetição e a rinite alérgica. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 18, n. 3, p. 86-90, 1995.

MORI, J. C.; PIRES, M.C.; GALVÃO, C.E.S.; MELLO, J.F.; MONTEALEGRE, F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, V. 56, P. 180-184, 2001.

MORTOZA JR., G. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In: LAGES, A. F. **Ginecologia e Obstetrícia-Manual Para o TEGO**, Belo Horizonte: MEDSI, 2000, 2ª ed., p.65-67.

MURPHY, J. W.; BISTONI, F.; DEEPE, G. S.; BLACKSTOCK, R. A.; BUCHANAN, K.; ASHMAN, R. B.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; FÈ D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. **Medical Mycology**, v. 36, suppl. 1, p. 109-118, 1998.

OHM, M. J.; GALASK, R. P. The effect of antibiotic prophylaxis on patients undergoing vaginal operations: II. Alterations of the microbial flora. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 123, p. 597, 1975.

OHM, M. J.; GALASK, R. P. The effect of antibiotic prophylaxis on patients undergoing total abdominal hysterectomy: II. Alterations of the microbial flora. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 125, p. 448, 1976.

ROMERO-PIFFIGUER, M. D.; VUCOVICH, P. R.; RIERA, C. M. Secretory IgA and secretory component in women affected by recidivant vaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 91, n. 3, p. 165-170, 1985.

ROSENZWEIG, M.; WALTER, M. Absorption of protein from the vagina and uterine cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 42, p. 286, 1943.

SAVOLAINEN, J. A standardized densitometric immunoblotting analysis of *Candida albicans* protein allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, p. 357-363, 1995.

SHAH, D.; LARSEN, B. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. **Mycopathologia**, v. 116, p. 203, 1992.

SILVA, D.A.O.; GERVÁSIO, A.M.; SOPELETE, M.C; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, LK.; CHAPMAN, M.D.; SUNG-SANG, J.S.; TAKETOMI, E.A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Derp2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 86, p. 545-550, 2001.

SMITH, A.M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; FU, S.M. Prevalence of IgG anti Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: Relationship of IgG and subclass antibody responses exposure and allergic symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 102-109, 1998.

SNAPPER, C. M.; FINKELMAN, F. D. Immunoglobulin Class Switching. In: PAUL, E. W. ed. **Fundamental Immunology**, Filadelfia: Lippincott-Raven, 1999, 4^a ed., p. 831-840.

SOBEL, J. D. Candidal Vulvovaginitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, n. 1, p. 153-165, 1993.

STROMBERG, N.; DEAL, C.; NYBERG, G.; NORMARK, S.; SO, M.; KARLSSON, K-A. Identification of carbohydrate structures that are possible receptors for *Neisseria gonorrhoeae*. **Proceedings of Natural Academy of Science U S A**, v. 85, p. 4902, 1988.

SWOBODA, R. K., BERTRAM, G., HOLLANDER, H., GREENSPAN, J. S., GREENSPAN, D., GOW, N. A. R., GOODAY, G. W., BROWN, J. P. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4263-4271, 1993.

THADEPHALI, H.; SAVAGE JR, E. W.; SALEM, F. A.; ROY, I.; DAVIDSON JR, E. C. Cyclic changes in cervical microflora and their effect on infection following hysterectomy. **Gynecological and Obstetric Investigation**, v. 14, p. 176, 1982.

TOHS, F. D.; DOUGLAS, L. J. Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. **Infectology and Immunology**, v. 60, p. 4734, 1992.

WARNOCK, D. W.; MILNE, J. D.; FIELDING, A. M. Immunoglobulin classes of human serum antibodies in vaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 63, n. 3, p. 173-175, 1978.

WARREN, N. G.; HAZEN, K. C. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: MURRAY, P. R.; et al., eds. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM-PRESS, 7 ed., p. 1184-1199, 1999.

WEINSTEIN, L.; HOWARD, J. H. The effect of estrogenic hormone on the H-ion concentration and the bacterial content of the human vagina, with special reference to the *Doderlein* bacillus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 1163, 1939.

WEINSTEIN, L.; MAWRO, N. W.; WORTHINGTON, R. V.; ALLEN, E. The influence of estrogenic hormone on the H-ion concentration and bacterial flora of the vagina of the immature monkey. **Yale Journal of Biological Medicine**, v. 11, pp. 141, 1938.

WITKIN, S. S. Immunology of the vagina. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, n. 1, p. 122-128, 1993.

WITKIN, S. S.; JEREMIAS, J.; LEDGER, W. J. A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 81, n. 2, p. 412-416, 1988.

YI, F. C.; CHEONG, N.; SHEK, P. C. L.; WANG, D. Y.; CHUA, K. Y.; LEE, B. W. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical Experimental Allergy**, v. 32, p. 1203-1210, 2002.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA EM GINECOLOGIA E IMUNOLOGIA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFU/FAEPU
AV. PARÁ, 1720 – BLOCO 4C, CAMPUS UMUARAMA
CEP 38.400-902, UBERLÂNDIA, MG
TELEFONE: 0XX34-3218-2195 – TELEFAX: 0XX34-3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO:

Eu _____, concordo em participar do projeto de pesquisa de nome: “Resposta anticórpica específica a *Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal”, que será realizado neste ambulatório, estando informado dos seguintes aspectos:

- necessidade de coleta de amostras de sangue através de retirada de sangue da veia do braço e lavado vaginal através de exame especular ginecológico com material de rotina de exame preventivo de câncer do colo do útero.
- realização de exames complementares como testes alérgicos na pele, de leitura imediata e tardia, por perfuração superficial de pele do antebraço.
- realização de exames complementares como coleta de sangue para exclusão de outras etiologias da candidíase vaginal, como: anemia, anti-HIV, glicose, dosagem de hormônios da glândula tireóide e teste de gravidez.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida sobre estes procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à investigação.

Terei a garantia de que a minha identificação, bem como as informações fornecidas e os resultados obtidos não serão informados para outras pessoas.

Uberlândia, de _____ de _____

TESTEMUNHAS: 1-

2-



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ambulatório de Pesquisa em Ginecologia e Imunologia

Fone: (034)3218-2195 Fax: (034)3218-2333

Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG

QUESTIONÁRIO REFERENTE À DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

" Resposta anticórpica específica a *Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vaginal"

DATA:

NÚMERO IDENTIFICADOR:

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:

IDADE:

Marque com um "X" a resposta positiva. Se você não sabe a resposta correta, por favor escreva "NÃO SEI" no espaço depois da questão.

ESTÁ SOB CUIDADO DE OUTRO MÉDICO NESTE MOMENTO()

DESDE QUANDO:

MOTIVO:

FUMA()-QUANTOS CIGARROS POR DIA().

BEBE BEBIDA DE ÁLCOOL()-QUAL:

QUE QUANTIDADE POR SEMANA:

TEM PROBLEMA DE PULMÃO()-QUAL:

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM PROBLEMA DE PRESSÃO()

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM PROBLEMA DE CORAÇÃO()-QUAL:

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM PROBLEMA DE ESTÔMAGO OU ÍNTESTINOS()-QUAL:

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM PROBLEMA DE FÍGADO()-QUAL:

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM PROBLEMA DE RINS()-QUAL:

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM REUMATISMO NO SANGUE()

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM INFLAMAÇÃO NAS JUNTAS OU REUMATISMO()

USA REMÉDIO()-QUAL:

TEM ANEMIA(), USA REMÉDIO()-QUAL

QUANDO SE MACHUCA SANGRA MAIS DO QUE O NORMAL()

QUANDO SE MACHUCA CICATRIZA NORMALMENTE()

TEM CONVULSÕES OU OUTRAS DOENÇAS NERVOSAS()

USA REMÉDIO() QUAL:

FAZ TRATAMENTO PSIQUIÁTRICO()

USA REMÉDIOS CONTROLADOS()-QUAIS:

TEM ALGUMA DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL()

QUAL:

TEM ALGUM TIPO DE CÂNCER()-QUAL:

FAZ TRATAMENTO()-QUAL:

TEM ALGUMA JUNTA ARTIFICIAL-PRÓTESE()-QUAL:

JÁ SOFREU ALGUMA CIRURGIA()-QUAL:

TEM ALGUMA OUTRA DOENÇA: HIV(), DIABETES(), HEPATITE(),
TUBERCULOSE(), DOENÇA DA TIREÓIDE(), DOENÇAS HORMONAIS(),

DEPRESSÃO(), DOENÇAS DE PELE()-QUAL:

DEFICIÊNCIA DAS DEFESAS-IMUNIDADE(), STRESS(), ANSIEDADE(),

OUTRAS()-QUAL:

ESTÁ EM USO DE ALGUMA MEDICAÇÃO:

ANTIBIÓTICO()-QUAL:

REPOSIÇÃO DE HORMÔNIO FEMININO()-QUAL:

HORMÔNIO CORTICÓIDE()-QUAL:

OUTRAS:

SENTE-SE CANSADA A MAIOR PARTE DO TEMPO()

TEM ALERGIAS: RINITE(), SINUSITE(), ASMA(), ALIMENTOS(), POEIRA(),
REMÉDIOS(), ESPERMA DO PARCEIRO(), CÂNDIDA(), GELÉIAS(), SUOR(),

BORRACHA DA CAMISINHA-LÁTEX(), ESPERMICIDAS(),

ABSORVENTES HIGIÊNICOS(), MEDICAMENTOS DE USO LOCAL(),

ARTIGOS DE BANHO(), PAPEL HIGIÊNICO(), VERMES INTESTINAIS(),

INFLAMAÇÃO DA VULVA CAUSADA POR SALIVA(), ESMALTE DE UNHA(),

PELE()-QUAL:

TEM A PELE SECA()

SUAS UNHAS SE QUEBRAM FACILMENTE()

EXISTE ALGUM IRRITANTE DE PELE : TECIDO E VESTUÁRIO()

QUAL:

TEM VERMELHIDÃO EM ALGUMA PARTE DO CORPO()

TEM COCEIRA OU ARDÊNCIA QUANDO USA SABONETE OU PERFUMES EM

ALGUMA PARTE DO CORPO()

MATERIAL DAS ROUPAS QUE USA: JEANS(), LYCRA(), NYLON(),

OUTROS: ,CORES:

, APERTADA()

HIGIENE: TIPO DE ABSORVENTES: COM ABAS()- QUAL:
NÚMERO DE BANHOS POR DIA(), DUCHAS VAGINAIS()
TIPO DE SABONETES: , SHAMPOOS:
CREMES:
HÁBITOS: ALIMENTAÇÃO:
FAZ EXERCÍCIO FÍSICO REGULARMENTE()-QUAL:
MORA EM CASA COM MOFO()-QUE LOCAL DA CASA TEM MOFO:

IDADE DO COLCHÃO QUE DORME:
IDADE DO SOFÁ QUE ASSENTA EM CASA:
MATERIAL DO SOFÁ:
TEM ALGUM OUTRO PROBLEMA QUE GOSTARIA DE CONTAR:

DOENÇAS DA FAMÍLIA:
GERAIS:

ALÉRGICAS:

QUEIXAS: CORRIMENTO(), MAL CHEIRO(), COCEIRA(), ARDÊNCIA()
DOR DURANTE A RELAÇÃO SEXUAL()
OUTRAS DORES()-LOCAL:
PARTES ENVOLVIDAS: VULVA(), VAGINA(), ÂNUS()
OUTRAS:

HÁ QUANTO TEMPO VEM TENDO ESTE PROBLEMA:
RELAÇÃO DOS SINTOMAS COM ACONTECIMENTOS DA VIDA PESSOAL:

JÁ TEVE ALGUMA DESSAS DOENÇAS: CÂNDIDA(), CONDILOMA-HPV(),
GARDNERELLA(), VAGINOSE BACTERIANA(), TRICHOMONAS(),
HERPES GENITAL(), OUTRAS:
FEZ EXAME PAPANICOLAU-PREVENÇÃO NA DATA:
RESULTADO DO EXAME PAPANICOLAU ANTERIOR:

ÚLTIMO EXAME PAPANICOLAU COM CÂNDIDA:

NÚMERO DE EXAMES PAPANICOLAU COM CÂNDIDA:

TRATAMENTOS UTILIZADOS: CREMES()-QUAL:

METRONIDAZOL(), ANTIFÚNGICO()

COMPRIMIDOS()-QUAL:

ANTIBIÓTICO()-QUAL:

VACINA ANTI-ALÉRGICA()

ALGUM MEDICAMENTO CAUSOU: ARDÊNCIA(), COCEIRA()

USA CALCINHA DE LYCRA(), ALGODÃO()

DORME DE CALCINHA()

LAVA A CALCINHA NO CHUVEIRO(), SECA NO BANHEIRO()

QUE SABÃO UTILIZA:

USA PROTETOR DE CALCINHAS()- QUANTAS VEZES POR SEMANA:

HISTÓRIA DO PASSADO GINECOLÓGICO:

IDADE DA PRIMEIRA MENSTRUÇÃO(), IDADE DA PRIMEIRA RELAÇÃO

SEXUAL(), FREQUÊNCIA DE RELAÇÕES SEXUAIS:

LUBRIFICAÇÃO(), SATISFAÇÃO(), MÉTODO PARA EVITAR GRAVIDEZ()

QUAL:

NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS()

APÓS RELAÇÃO COM ALGUM PARCEIRO SENTE COCEIRA(), ARDÊNCIA(),

CORRIMENTO()

IRREGULARIDADE NO CICLO MENSTRUAL:

HISTÓRIA DO PASSADO DE GRAVIDEZ: , QUANTAS VEZES FICOU GRÁVIDA

NO TOTAL(), QUANTOS FILHOS(), QUANTOS ABORTOS()

TIPOS DE PARTO:

DATA DO INÍCIO DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO:

DECLARO SEREM VERDADEIRAS TODAS AS INFORMAÇÕES DADAS E ME RESPONSABILIZO POR TER DADO INFORMAÇÕES ERRADAS OU DEIXADO DE DAR ALGUMA DELAS.

Assinatura da Paciente

Assinatura da Enfermeira Assistente

Assinatura do Médico Assistente

Referências:

Summers, P. R. et al, The management of obscure or difficult cases of vulvovaginitis, 1993, vol 36, n1, p208. University of Utah School of Medicine. Dpt. of Obstetrics and Gynecology.

Moraes, P.S.A. & Taketomi, E.A. Allergic vulvovaginitis. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2000;85:253-267.