CARLA SILVA SIQUEIRA

Diagnóstico de sífilis em lesões orais. Estudo comparativo utilizando-se as técnicas histoquímica e imuno-histoquímica

São Paulo

2012

CARLA SILVA SIQUEIRA

Diagnóstico de sífilis em lesões orais. Estudo comparativo utilizando-se as técnicas histoquímica e imuno-histoquímica

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Siqueira, Carla Silva

Diagnóstico de sífilis em lesões orais : estudo comparativo utilizando técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas : [versão original] / Carla Silva Siqueira; orientador Fernando R. X. da Silveira. -- São Paulo, 2012.

72p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Sífilis -- Lesões. 2. Patologia bucal. 3. Diagnóstico bucal -- Técnicas. 4. Histoquímica. 5. Imunohistoquímica. I. Silveira, Fernando R. X. de. II. Título.

Siqueira CS. Diagnóstico de sífilis em lesões orais. Estudo comparativo utilizando-se as técnicas histoquímica e imuno-histoquímica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais **Odelmo e Arli**, pelo constante carinho, amor e apoio incondicional às minhas escolhas. Obrigada por me darem todas as condições necessárias para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional e pelo exemplo que me representam em todos os aspectos da vida. Saibam que o amor de vocês é o que me impulsiona a querer ser um ser humano sempre melhor. Amo vocês infinitamente, por todas as vidas!

Ao meu irmão **Odelmo Júnior**, que sempre me aconselhou e me deu empolgação a todas as minhas escolhas profissionais, por mais difíceis que parecessem. Obrigada pelos momentos de amizade, alegrias e carinhos. Desejo a você sempre o melhor nessa vida. Estaremos sempre juntos!

Ao meu noivo **Alisson**, que por várias vezes aguentou meus desabafos e angústias, sempre com palavras positivas, me incentivando a me dedicar até o fim. Mesmo com a distância, estivemos sempre presentes na vida um do outro, com muito carinho e companheirismo. Obrigada pela presença, mesmo na ausência.

À minha família e amigos que, mesmo longe, vibraram muito por mim.

A Deus por se mostrar presente em cada momento da minha vida!

Amo todos vocês!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Fernando Ricardo Xavier da Silveira**, agradeço pela receptividade inicial e pelo cuidado com que corrigiu a tese. Obrigada por me deixar “livre” para aprender com os vários trabalhos em que participei e por confiar que faria o que me foi proposto.

À professora **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, por me orientar em todos os aspectos. Agradeço pela disponibilidade, carinho, confiança e conversas sempre tão prazerosas. Aprendi muito com sua maneira delicada e competente em ensinar. Levarei seus ensinamentos para sempre em minha vida.

Ao professor **Fábio Daumas Nunes**, agradeço pela porta da sua sala estar sempre “aberta” aos meus constantes questionamentos, que foram muitos! Obrigada pelo apoio, atenção e profissionalismo, que contribuiu muito para meu crescimento como pesquisadora e por compartilhar todos os meus progressos e minhas conquistas.

Ao professor **Sérgio Vitorino Cardoso**, agradeço pelo apoio e aprendizado desde os tempos de faculdade. Essa parceria esteve sempre presente e continuará mesmo depois do Doutorado. Obrigada pelo exemplo de homem e profissional que sempre representou em minha vida.

Aos professores do programa de Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada, **Dra Marina Helena Cury Gallottini, Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Dra Marília Trierveiler Martins, Dra Andréa Mantesso e Dra Karem Lopez Ortega**, agradeço pelos valiosos ensinamentos da rotina diagnóstica, pelo convívio agradável e integração com todos os alunos da pós-graduação.

Aos professores do programa de Diagnóstico Bucal **Dr. Dante Antônio Migliari, Dr. Fábio de Abreu Alves, Dr. Celso Augusto Lemos Júnior, Dr. Norberto Nobuo Sugaya e Dra. Andrea Lusvarghi Witzel**, agradeço pelos ensinamentos na clínica de Estomatologia, que contribuíram sobremaneira ao meu conhecimento profissional.

A todos os funcionários das disciplinas de Patologia e Estomatologia, **Nair, Néia, Zilda, Bia, Elisa, Adriana, Edna, Cida** por toda a ajuda e desabafo nos momentos difíceis e divertimento nos momentos livres. Agradeço, em especial, ao **Juvani** por ter se tornado um amigo e a quem dedico grande parte dessa tese, pela ajuda. Não poderia deixar de agradecer em especial à **Cecília** por ter sido uma amiga muito querida, compartilhando vários momentos de angústia e à **Nina**, por ter sido uma “mãe” querida e preocupada, abrindo as portas de sua casa e de sua vida, com conselhos e carinho, bem como a **Ritinha**.

Ao querido amigo **Gustavo**, a quem dedico não só a minha tese, mas o meu título. Não fosse por você, talvez hoje não estivesse na USP e, mais que isso, foi um irmão em todos os meus dias aqui em São Paulo. Juntos nós trabalhamos, lutamos, desabafamos, caímos, levantamos, aprendemos e, acima de tudo, nos divertimos.

Obrigada por ser uma pessoa tão sensata e por todo o apoio de sempre. Sentirei saudades todos os dias.

A todos os amigos da Estomatologia, agradeço os vários momentos juntos, em especial às amigas do “Rechaud” (**Anna Torrezani, Ana Paula Cândido, Bianca Freo, Carina Domaneschi, Camila Gallo, Érica Patrício, Ingrid Schneider, Maria Ângela, Vivian Pelegrini, Lígia Fernandes, Alessandra Camargo**), obrigada pela amizade, carinho, companheirismo, passeios e vários momentos de divertimento.

A todos os amigos e colegas da Patologia, só tenho a agradecer, cada um contribuiu muito com meu aprendizado e juntos nos ajudamos em todos os momentos. Vários deles se tornaram amigos íntimos.

Agradeço em especial à **Carina Esteves, Bianca Pulino, Michella Lima, Renata Caraméz, Felipe Daltoé, Karin Sá, Rita Barcessat, Ana Cláudia Luiz, Nathalie Rezende, Fabiana Martins, Lília Rocha, Fábio Prosdócimi, Kauê Pavanello, Ana Paula Molina e Luana Bonfim**. Vocês serão a parte mais difícil da despedida! Levarei vocês para sempre em meu coração! Sentirei muitas saudades!

Karin, Bianca, Michella, Lília, Alessandra, Gustavo e Juvani muito obrigada por me ajudarem em momentos finais e decisivos da minha tese.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no doutorado da FOU SP.

“Nada no mundo se compara à persistência. Nem o talento; não há nada mais comum do que homens mal sucedidos e com talento. Nem a genialidade; a existência de gênios não recompensados é quase um provérbio. Nem a educação; o mundo está cheio de negligenciados educados. A persistência e a determinação são, por si só, onipotentes”.

Calvin Coolidge

RESUMO

Siqueira CS. Diagnóstico de sífilis em lesões orais. Estudo comparativo utilizando-se as técnicas histoquímica e imuno-histoquímica [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

A sífilis é uma doença infecciosa, cujo agente etiológico é o *Treponema pallidum*. Pode ser transmitida sexualmente ou verticalmente, via placenta. Seus estágios variam entre sífilis primária, sífilis secundária, sífilis latente e sífilis congênita. Dentre os diagnósticos mais eficazes, encontram-se os testes sorológicos, porém os falsos positivos e falsos negativos no estágio primário levam à procura de uma forma mais eficaz de se determinar, precocemente, a doença. Além disso, por várias razões, nem sempre o profissional clínico suspeita das lesões presentes na mucosa oral, cogitando de outras hipóteses diagnósticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar imuno-histoquimicamente e histoquimicamente lesões bucais biopsiadas cujo aspecto histológico levou à suspeita de sífilis, buscando identificar os microorganismos, bem como correlacionar o quadro sorológico quando positivo. Para o estudo foram incluídas 34 lesões suspeitas de sífilis, que foram submetidas à reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-treponema e técnica histoquímica de coloração pela prata. Dos 34 casos avaliados 13 foram positivos para o anticorpo anti-treponema, todos posteriormente diagnosticados como sífilis secundária, com positividade sorológica, exceto por um caso em que a sorologia não foi realizada. Quando se comparou os métodos de diagnóstico, a técnica de coloração por prata obteve sensibilidade de 46,15% e a de imuno-histoquímica foi de 92,3%. Os aspectos histológicos variaram em um grande número de achados, dentre eles: intensa exocitose, infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário (justaepitelial e perivascular), áreas de ulceração, epitélio paraqueratinizado, edema, espongiose e hiperplasia epitelial. A marcação imuno-histoquímica dos treponemas foi, principalmente, epitelial (61,5%) e esse método se mostrou um meio de diagnóstico rápido, simples e eficiente no diagnóstico de lesões orais de Sífilis.

Palavras-chave: Sífilis. Diagnóstico precoce. Técnicas e procedimentos diagnósticos.

ABSTRACT

Siqueira CS. Diagnosis of syphilis in oral lesions. A comparative study using techniques of histochemistry and immunohistochemistry [Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

Syphilis is an infectious disease, whose etiologic agent is *Treponema pallidum*. It can be transmitted sexually or vertically via the placenta. Its stages include primary syphilis, secondary syphilis, latent syphilis and congenital syphilis. Among the diagnoses most effective are the serological tests, but false positives and false negatives in the primary stage lead to demand for a more effective way to determine the disease earlier. In addition, for various reasons, not always the professional clinical suspicion of lesions present in the oral mucosa, thinking in other possible diagnoses. The objective of this study was to identify microorganisms and set the best way forward to a diagnostic framework confirmed positive serology. The results for syphilis lesions in the oral mucosa corresponded to 13 cases, all of secondary injuries, with positive serology for syphilis and in only one of them serology had not been held. In a comparison of diagnostic methods, the technique of silver staining achieved sensitivity of 46.15% and immunohistochemistry was 92.3%. The histological features varied in a large number of findings, including: intense exocytosis, inflammatory infiltrate, predominantly plasmacytic (band-like and infiltrate perivascular), areas of ulceration, parakeratinized epithelium, edema, spongiosis and epithelial hyperplasia. The immunohistochemical staining of treponemes was mainly epithelial (61.5%) and this method was a rapid, simple and efficient means in the diagnosis of oral lesions of syphilis.

Keywords: Syphilis. Early diagnosis. Diagnostic techniques and procedures.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 Lesões de sífilis secundária em mucosa oral. Nota-se a presença de áreas erosivas e ulceradas em mucosa jugal (A), úlcera em dorso de língua (B), nódulo ulcerado em dorso de língua (C) e áreas erosivas permeadas por placas esbranquiçadas em palato (D).....42
- Figura 5.2 Paciente portador de sífilis e infectado pelo vírus HIV. Nota-se a presença de áreas ulceradas em lábio inferior (A) e dorso de língua (B).....42
- Figura 5.3 Lesões de sífilis secundária, com comprometimento da pele em regiões de mãos formando áreas descamativas (A), tronco (B), pescoço (C) e áreas de placas esbranquiçadas em mão (D).....43
- Figura 5.4 Diversas formas clínicas de lesões de sífilis em forma de placas mucosas e erosões.....44
- Figura 5.5 Corte de mucosa evidenciando áreas de ulceração e intenso infiltrado inflamatório difuso na lâmina própria em aumento de 100 X (A) e área histológica evidenciando intensa exocitose em tecido epitelial (B) (HE 400 X).....45
- Figura 5.6 Aspecto histológico de lesões de sífilis em mucosa oral. Em (A) visão panorâmica de corte de mucosa mostrando intenso infiltrado inflamatório justaepitelial e perivascular; em maior aumento nota-se a presença de intenso infiltrado inflamatório justaepitelial (B). Observa-se a predominância plasmocitária no infiltrado perivascular (C) e também no infiltrado difuso (D).....45
- Figura 5.7 Coloração para Warthin-Starry marcando áreas basais e supra-basais de epitélio em um aumento de 100 X (A) e em um aumento de 400X (B). Observa-se, ainda a marcação das espiroquetas de *Treponema pallidum* em aumento de 400X (C) e 1000X (D).....48
- Figura 5.8 Marcação imuno-histoquímica do *Treponema pallidum* em tecido epitelial (A), (B), (C), e marcação em tecido epitelial e conjuntivo (D). (Estreptoavidina-biotina, 400 X).....50
- Figura 5.9 Nota-se a marcação imuno-histoquímica para *Treponema pallidum*, evidenciando a forma em espiroqueta da bactéria (Estreptoavidina-biotina, 1000 X).....50

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1	Porcentagem de sensibilidade e Especificidade em Testes para lesões de Sífilis segundo Carlson et al., 2011.....	27
Quadro 2.2	Principais aplicações e limitações dos testes diagnósticos nos diferentes estágios da sífilis segundo Ratnam (2005)	29; 30
Quadro 5.1	Dados clínicos dos casos confirmados para Sífilis.....	40
Quadro 5.2	Características clínicas e histopatológicas de todos os casos que tiveram suspeita de Sífilis confirmada.....	46; 47
Quadro 5.3	Resultados das marcações histoquímicas, imuno-histoquímicas e dados sorológicos dos casos confirmados.....	51; 52

LISTA DE TABELA

Tabela 5.1 - Dados relativos a predomínio de etnias e principais hipóteses diagnósticas.....	40; 41
--	--------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
BSA	Soro-albumina-bovina
CDC	Centers for Disease Control
CSF	Cerebrospinal fluid
DAB	Diamino benzydina
DHT	Delayed-type hypersensitivity
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo
FTA-ABS	Fluorescent Treponemal Antibody Absorption
HIV	Human immunodeficiency virus
HSH	Homem que faz sexo com homem
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RPR	Rapid Plasma Reagin
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
VCAM	Vascular cell adhesion

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	34
4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	35
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A sífilis caracteriza-se por ser uma doença infecciosa sistêmica causada por uma espiroqueta filamentosa anaeróbia, o *Treponema pallidum*. Os humanos são os únicos vetores conhecidos (Lafond; Lukehart, 2006). Esta bactéria não resiste muito tempo fora do seu ambiente, é destruída pelo calor e falta de umidade, e divide-se transversalmente a cada 30 horas (Singh; Romanowski, 1999). A doença pode ser transmitida sexualmente (sífilis adquirida) ou verticalmente (sífilis congênita) via placenta, da mãe para o feto. Outra forma de transmissão, porém menos comum, seria através de objetos contaminados e transfusão sanguínea (Little, 2005; Avelleira; Bottino, 2006).

A evolução da sífilis envolve quatro estágios: sífilis primária, sífilis secundária, sífilis latente e sífilis terciária. Cada estágio possui diferentes características clínicas e diferença de infectividade (Kent; Romanelli, 2008).

A lesão inicial é chamada de cancro duro, caracterizada clinicamente por uma lesão única ulcerada, indolor, com bordas endurecidas. Histologicamente resulta em um processo inflamatório intenso com a presença de plasmócitos, macrófagos e linfócitos (Scott; Flint, 2005; Woods, 2005). O cancro ocorre no local da infecção, geralmente, nas regiões genitais e orais e possui uma regressão espontânea entre três a oito semanas, sem deixar cicatriz (Little, 2005; Avelleira; Bottino, 2006; Ficarra; Carlos, 2009).

O segundo estágio ocorre quando não tratado o primeiro estágio no intervalo de duas a dez semanas e evolui com a multiplicação e disseminação do *T. pallidum* (Woods, 2005). Nesta fase, as lesões podem se manifestar clinicamente sob várias formas, envolvendo diferentes órgãos e mimetizando várias outras doenças, tanto clinicamente, quanto histopatologicamente (Compilato et al., 2009). Além disso, sintomas sistêmicos como cefaléia, febre, dores musculares, perda de peso e lesões cutâneas variadas, principalmente palmo-plantares, são notados (Lautenschlager, 2006). As lesões mais comuns na cavidade oral, no estágio secundário, são as placas mucosas, correspondentes à sífilis maculo-papular e aparecem, usualmente, nos lábios, gengivas, língua, palato, úvula, amígdalas e faringe posterior (Mullooly; Higgins, 2010). Raramente a sífilis secundária se apresenta com nódulos solitários (Leão et al., 2006).

Quando não tratada, a sífilis secundária regride em cerca de um a dois meses, quando começa, então, a fase latente. Esta é definida como um período assintomático, com relativo controle imunológico e níveis baixos de microorganismos, podendo durar vários anos (Woods, 2005). Em torno de 15 a 40% dos indivíduos não tratados desenvolverão a sífilis terciária (Salata, 2002), com acometimento de diversos órgãos, principalmente o sistema cardiovascular e sistema nervoso central, e o desenvolvimento da neurosífilis (Noel et al., 2011). As lesões, nessa etapa, aparecem na forma de granulomas (gomos) que podem levar à destruição tecidual local em múltiplos órgãos (Lautenschlager, 2006).

A sífilis congênita é marcada pela transmissão da doença ao feto, em qualquer estágio da gravidez materna. No entanto, o diagnóstico é problemático, pois a maioria das crianças se apresenta de forma assintomática ao nascimento, vindo a apresentar os sintomas em uma fase mais tardia. Estes incluem alteração e desenvolvimento dental atrasado, alterações ósseas e nariz em sela (Walker; Walker, 2007; Herremans et al., 2010).

O diagnóstico da sífilis pode ser feito através de exame clínico, associado aos testes sorológicos e histopatológicos. A escolha dos exames laboratoriais mais adequados deverá considerar a fase evolutiva da doença. Na sífilis primária e em algumas lesões da fase secundária, o diagnóstico poderá ser direto, isto é, feito pela demonstração do treponema. A partir da segunda ou terceira semana após o aparecimento do cancro, pode-se utilizar a sorologia (Avelleira; Bottino, 2006).

Os exames sorológicos podem ser divididos em treponêmicos (FTA-ABS) e não-treponêmicos (VDRL, RPR). Estes testes são bastante eficientes, porém, alguns falsos negativos podem ocorrer, geralmente, em dependentes de drogas, portadores de doença de colágeno, portadores de AIDS, hanseníase e em diversas outras situações. Além disso, os testes treponêmicos variam em sua reatividade na sífilis primária (Larsen et al., 1995).

O exame histopatológico das lesões bucais não apresenta características específicas, porém um infiltrado inflamatório plasmocitário perivascular é bastante frequente tanto em estágios primários, como em secundários (Hoang et al., 2004), além de características como um infiltrado linfocitário, endarterites, hiperplasia epitelial atípica e células gigantes (Barrett et al., 2004).

Estudos mostram que o padrão histopatológico associado à imuno-histoquímica não só possui positividade em quase todos os casos, ressaltando-se

que em casos de sífilis primária possui um aspecto diferente da sífilis secundária (Martín-Ezquerria et al., 2009). Porém, esses trabalhos foram realizados, em sua maioria, em manifestações de sífilis em pele.

Ao longo das duas últimas décadas, vários trabalhos descrevem o método da PCR (polymerase chain reaction) como um procedimento diagnóstico importante para sífilis (Centurion-Lara et al., 1997; Liu et al., 2001; Martin et al., 2009). A maioria dos procedimentos usa espécimes de swab obtidos de úlceras ou de fluido cefalorraquidiano (Hay et al., 1990; Noordhoek et al., 1991; Sutton et al., 2001). A PCR é amplamente utilizada em pesquisa básica, em medicina forense e no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas (Nascimento et al., 2003), desde que se descubra o *primer* específico para cada uma. Este método é considerado bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (Linscott, 2002).

Outros métodos utilizados para diagnóstico de sífilis são as colorações de prata para marcação das espiroquetas, principalmente as técnicas de Dieterle, Steiner e Whartin-Starry. Esses métodos possuem como principais vantagens, a rapidez e o baixo custo do processo.

A presença das espiroquetas é maior quanto mais precoce for a doença (Martín-Ezquerria et al., 2009), portanto, seria importante utilizar uma técnica mais específica, que evitasse os falso-negativos e pudesse dar um diagnóstico precoce da doença. A imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-treponema, em biópsias de lesões bucais, seria um método eficiente na identificação do microorganismo em seus estágios primários, além de permitir o diagnóstico diferencial de outras lesões inflamatórias orais, cujo aspecto histológico não é patognomônico. Frente a esses achados, no presente estudo propusemos-nos a avaliar a significância da imuno-histoquímica como método auxiliar do diagnóstico da sífilis em lesões orais biopsiadas para diagnóstico. Como comparação, foi utilizado o método de coloração de Warthin-Starry, pela maior rapidez e menor custo, com vistas a definir o melhor método de identificação das espiroquetas, em casos que aparecem na rotina diagnóstica sem suspeita clínica de sífilis por parte dos cirurgiões-dentistas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico e Prevalência

A sífilis é um problema de saúde pública mundial, descrita desde os tempos remotos, tendo sido reconhecida no Oriente Médio antes de Cristo. A origem da sífilis tem sido assunto controverso e duas teorias tentam explicar seu surgimento (Rotschild, 2005). Uma das teorias afirma que a doença era endêmica na América e que de lá teria sido introduzida e disseminada na Europa pelos marinheiros de Cristóvão Colombo. Já a segunda teoria sugere que as treponematoses já existiam no território europeu, sendo causadas por um único microorganismo que, com o passar do tempo, foi se diferenciando e assumindo características que aumentaram sua virulência e permitiram a transmissão sexual e o desencadeamento de epidemias (Quétel, 1992; Morton; Rashid, 2001). De fato, a partir do século XV, os europeus se depararam com o surgimento de doenças que, até aquele momento, não existiam no Ocidente, ou se existiam não eram reconhecidas pelos médicos.

Em 1530 surge o nome “sífilis”, em um poema escrito por Girolamo Fracastoro de Verona intitulado “Syphilis sive morbus gallicus”, em que conta o mito do pastor Syphilus que amaldiçoou o deus Sol e foi punido com a doença (Thyresson, 1995). Em 1579 surge o termo “lues”, que em latim significa peste ou epidemia, idealizado por Jean Fernel (Souza, 1996).

O mercúrio foi o primeiro tratamento específico da sífilis e foi utilizado por cerca de 450 anos. Acreditava-se que o seu uso contínuo, seguido de jejuns prolongados, era capaz de curar a enfermidade. Somente no século XX surgiu, efetivamente, o tratamento para sífilis, quando foi identificado o germe causador da doença e quando ficou certificado que a penicilina, introduzida na década de quarenta, era o melhor tratamento para a sua cura (Grispan, 1973).

A sífilis é uma doença infecciosa crônica, que acomete praticamente todos os órgãos e sistemas e desafia há séculos a humanidade. Apesar do tratamento eficaz e de baixo custo, continua sendo problema de saúde pública até os dias atuais (Avelleira; Bottino, 2006). Com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), houve um redimensionamento das doenças sexualmente transmissíveis. O papel importante da sífilis na transmissão do vírus HIV ocasionaria

novo interesse pela doença e a necessidade de estratégias para seu controle (Avelleira; Bottino, 2006).

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível (DST) causada por uma espiroqueta microaerófila, gram-negativa, o *T. pallidum*, cuja sobrevivência fora do hospedeiro é bastante limitada (Dahle et al., 2003) e identificada, primeiramente, em 1905 por Fritz Schaudinn. O *T. pallidum* possui como único hospedeiro o homem, devido sua capacidade limitada na síntese de seus próprios bionutrientes (Woods, 2005; Ficarra; Carlos, 2009) e sua classificação recente a divide em sífilis precoce, que envolve as fases: primária, secundária e latente precoce; e sífilis tardia, dividida em sífilis latente tardia e terciária (Little, 2005). Durante a sífilis precoce, o paciente é infeccioso e sua infectividade vai diminuindo ao longo do tempo, sendo menor em pacientes portadores de sífilis tardia (Scott; Flint, 2005).

A patogênese da sífilis não foi clara até a identificação do agente causador "Spirochaeta pallidum" por Schaudinn e Hoffmann em 1905. Antes desse tempo, de acordo com Osler e colaboradores (1914): "A história da busca pela causa da sífilis é um conto para fazer o luto criterioso. Cento e vinte e cinco causas de sífilis têm sido estabelecidas durante os últimos 25 anos". Para Fritz Schaudinn, um parasitologista, o microorganismo era discernido como transparente, espiral, delicado, filamentado em secções de tecido não fixados. O nome da espécie "pallida" (claro) foi usado devido a extraordinária dificuldade na coloração do organismo. Devido a estas características, muitas tentativas anteriores de identificar o agente causador das lesões da sífilis não foram bem sucedidas. O uso da coloração à base de prata de Levaditi em 1905, aumentou muito a capacidade de detectar o organismo, em tecidos. Em 1906, o *T. pallidum* foi identificado em lesões da aorta (Reuter, 1906) e foi o patologista americano James Homer Wright, quem pela primeira vez identificou o microorganismo em gomas (granulomas de sífilis terciária), utilizando o procedimento de coloração por prata, em 1910. Até que o *T. pallidum* foi definitivamente demonstrado estar presente em lesões terciárias, as manifestações da sífilis terciária não eram claramente associados com a infecção por esse microorganismo.

A Organização Mundial da Saúde estima a incidência de Sífilis em 12 milhões de novos casos a cada ano, sendo que mais de 90% desses casos ocorrem em países em desenvolvimento (Hook; Peeling, 2004). Houve recrudescimento da sífilis na Irlanda (Hopkins et al., 2004), Alemanha (Marcus et al., 2005) e cidades

americanas, como San Francisco e Los Angeles, em grupos com comportamento de risco, como homens que fazem sexo com homens (HSH) e profissionais do sexo (Wong et al., 1999; Mgnone et al., 2002; Dilley et al., 2004; Buchacz et al., 2005). Nos Estados Unidos, em 2004 houve aumento de 11,2% dos casos de sífilis primária, que passaram de 7.177 em 2003 para 7.980 em 2004 (Centers of Disease Control and Prevention, 2005).

Em relação à sífilis congênita, os dados obtidos em programas de saúde pré-natal e maternidades mostraram soroprevalências elevadas, principalmente em países africanos (Azeze et al., 1995; Leroy et al., 1995; Temmerman et al., 2000).

No Brasil, em 2003, estimaram-se 843.300 casos de sífilis. A estimativa da OMS de infecções de sífilis por transmissão sexual, em população sexualmente ativa, a cada ano, é de 937 mil novos casos. Como a doença não era de notificação compulsória até o ano de 2010 (Penna et al., 2011), os estudos epidemiológicos de sífilis adquirida eram realizados em serviços que atendem DST ou grupos selecionados, como gestantes, soldados, prisioneiros, dentre outros (Brasil, 2005; Szwarcwald et al., 2005; Codes et al., 2006). A notificação compulsória de sífilis congênita em nascidos vivos se iniciou no ano de 1986 e em mulheres grávidas, em 2005 (Penna et al., 2011).

Apesar do declínio que houve da doença no final de 1990, devido a medidas de saúde pública e prática de sexo seguro entre os grupos de alto risco, a incidência da Sífilis passou de 2,1 casos a cada 100.000 habitantes para 3,3 casos a cada 100.000 habitantes no ano de 2007 (Eaton, 2009). Embora a sífilis seja uma infecção bem conhecida, seu diagnóstico, terapia e controle ainda continuam um desafio, particularmente para aqueles profissionais de saúde com pouca experiência com essa doença (Carlson et al., 2011).

2.2 Patogenia

O microorganismo penetra tanto mucosas íntegras quanto pele ferida, que estejam expostas, ocorrendo uma multiplicação do mesmo, principalmente em região perivascular, onde ocorre a disseminação pela circulação linfática e sanguínea, acometendo vários órgãos, principalmente o sistema nervoso central

(Hook; Marra, 1992). Esse processo ocorre com a ajuda da produção de hialuronidase e, a partir daí, as manifestações passam por períodos que levam à classificação da doença em estágios (Woods, 2005). Tanto as espiroquetas da sífilis, quanto outros treponemas (*T. pallidum subsp. Pertenuae*; *T. pallidum subsp. endemicum*; *T. carateum*), não podem ser cultivados in vitro (Tramont, 2005; Sanchez, 2008).

De acordo com os estágios de ocorrência, a sífilis adquirida é classificada em quatro estágios: primária, secundária, latente (precoce ou tardia) e terciária (Little, 2005; Compilato et al., 2009). Esses estágios clínicos, por sua vez, refletem a interação do agente infeccioso com o hospedeiro e os efeitos da resposta imune na infecção (Carlson et al., 2011).

Devido à dependência do crescimento do *T. pallidum* em relação à temperatura, as superfícies externas são a principal zona de combate, em que os mecanismos efetores imunes tentam derrotar um grande número de microorganismos, que se proliferam rapidamente. Já os órgãos internos evidenciam características da resposta imune (linfadenopatia ou esplenomegalia) durante os estágios primário e secundário da infecção e, no estágio terciário, a inflamação crônica (granulomas) é o reflexo de uma resposta imune inadequada a uma infecção persistente (Carlson et al., 2011). De particular importância é a força da hipersensibilidade do tipo tardia (DHT), que é mediada por células CD4+. Anticorpo humoral ou células T citotóxicas CD8+ são relativamente ineficientes na limpeza das infecções sífilíticas ou no controle da progressão da lesão; as fases secundária e terciária só ocorrem devido à ineficiência da resposta DHT (Carlson et al., 2011).

A resposta DHT se refere a uma atividade benéfica das células imuno mediadas do hospedeiro, caracterizada por uma expansão de população de células T-antígeno-específicas que produzem citocinas localmente, ativando e recrutando linfócitos e macrófagos adicionais (Sell, 2001). Macrófagos se acumulam no local de DHT e tornam-se ativados através de interações de células Th1 CD4+, protegendo contra infecção através de destruição e limpeza dos microorganismos. No entanto, antígenos persistentes e localizados podem levar a uma excessiva resposta inflamatória crônica traduzindo inflamação granulomatosa, destruição tissular e formação de órgãos linfóides secundários (Sell, 2001; Zinkernagel, 2002). Neste cenário, acredita-se que os granulomas resultem de um antígeno infeccioso persistente e não-degradável (Carlson et al., 2011). Em indivíduos imunodeprimidos,

um número maciço de *T. pallidum* pode ser encontrado em órgãos internos, com pouca ou nenhuma inflamação, o qual suporta a teoria de que antígenos persistentes levam a células T-tolerantes e células T-independentes a uma indução de resposta de células B (Zinkernagel, 2002). A ativação de sífilis latente é vista, muitas vezes, durante o início da AIDS, relacionada com a imunossupressão, indicando que a perda de imunidade neste momento permite crescimento da infecção existente (Carlson et al., 2011).

2.3 Características clínicas e histológicas

A sífilis primária é caracterizada pela presença da lesão inicial, denominada cancro, que surge no local da inoculação. O cancro se inicia como uma pequena mácula que se torna uma pápula rósea e, então, progride para uma erosão ou úlcera indolor. O tamanho varia de 0,3 a 3 cm e pode regredir sem tratamento em um período entre três a oito semanas (Ackerman, 1985; Ackerman AB et al., 1997 apud Lee; Kinghorn, 2008, p. 330-3¹; Ficarra; Carlos, 2009). O cancro clássico é solitário, redondo ou oval, de margens endurecidas nítidas, base fina serosa e uma borda hemorrágica não purulenta. No entanto, apenas por volta da metade dos indivíduos afetados terão o cancro clássico sendo que outros terão úlceras com bordas não endurecidas ou lesões semelhantes a cancro (Chapel, 1978). Pode haver co-infecção com outras doenças, como a gonorréia (Carlson et al., 2011). A maioria dos cancros ocorre em região genital e, quando extra-genitais, aparecem, em sua maioria, na mucosa oral. A transmissão da sífilis também pode acontecer através de agulhas contaminadas (principalmente no caso de usuários de drogas) ou transfusão sanguínea. Nesse caso, o cancro primário não se desenvolve (Stokes, 1934).

As características histopatológicas da sífilis primária incluem mudanças no epitélio como acantose, espongirose e exocitose de linfócitos. No centro do cancro o epitélio é escasso ou completamente ausente, com presença de células

¹ Ackerman AB Chongchitnant N, Sanchez J, et al. Syphilis. Histologic Diagnosis of of Inflammatory Skin Disease: An Algorithmic Method Based on Pattern Analysis. 2nd ed. Baltimore, MD: Williams &Wilkins; 1997;744–51.

inflamatórias. O tecido conjuntivo apresenta edema permeado por um denso infiltrado inflamatório plasmocitário perivascular e intersticial linfóide (Barrett et al., 2004). Observa-se, ainda, proliferação de células endoteliais e endarterites (Quatresooz; Piérard, 2009).

Durante o desenvolvimento da sífilis primária há mudanças sistêmicas como a disseminação dos microorganismos do sítio da infecção via linfática para o sangue em poucas horas. A resposta imune precoce é caracterizada por esplenomegalia e linfadenopatia regional, sendo a ocorrência desta última de sete a dez dias após o desenvolvimento do cancro genital (Domantay-Apostol et al., 2008).

A sífilis secundária se desenvolve entre duas e dez semanas após o primeiro contato com o microorganismo. Esse estágio é resultante da disseminação hematogênica e da colonização dos microorganismos em vários órgãos, além das manifestações mucocutâneas (Ficarra; Carlos, 2009). Erupções de extensões variáveis são os sintomas mais comuns presentes (Domantay-Apostol et al., 2008), tipicamente não causam prurido e se desenvolvem como máculas simétricas róseas ou avermelhadas, que podem progredir para pápulas ou pústulas. Se não tratadas, as erupções se resolvem em algumas semanas sem complicações. As localizações anatômicas mais comuns são braços, palmas das mãos, tronco e sola dos pés. Ocasionalmente em torno de 5 a 6% dos pacientes podem desenvolver perda de cabelo na barba, sobrancelhas e couro cabeludo (alopecia) (Ficarra; Carlos, 2009). A sífilis secundária tem sido denominada “grande imitador” pelo fato de suas lesões de pele mostrarem grande diversidade de morfologia clínica e histológica (Carlson et al., 2011), imitando alopecia areata (Bi et al., 2009), penfigóide bolhoso (Lawrence; Saxe, 1992), hiperplasia linfóide cutânea (McComb et al., 2003), eritema multiforme (Wu et al., 2006), histiocitoma, hanseníase (Fonseca et al., 1999), líquen plano (Carbia et al., 1999), lúpus eritematoso (Shatley et al., 2001), micoses (Liotta et al., 2000), pênfigo vulgar (Mignogna et al., 2009), psoríase (Talanin et al., 1994) e sarcoidose (Papini et al., 1998). As placas mucosas são semelhantes às lesões em pele e são típicas em regiões de língua, lábios e genitálias, contando com grande quantidade de microorganismos (Carlson et al., 2011).

As características histológicas dessa fase são bastante diversas e apresenta infiltrado inflamatório variando entre moderado e intenso, crônico e agudo (Ackerman, 1985). A característica mais comum é de se apresentar em banda, justaepitelial, e perivascular. Números variados de queratinócitos necróticos também

são notados e características psoriasiformes são manifestadas através de acantose, paraqueratose e hiperplasia da epiderme. Nota-se, ainda, um envolvimento endotelial resultante da proeminência dessa camada de células e vasos sanguíneos dilatados (Martín-Ezquerro et al., 2009). Comparando-se com a sífilis primária, que apresenta predomínio de linfócitos Th1 CD4+, a sífilis secundária apresenta um predomínio de linfócitos T CD8+, o que pode estar relacionado com a inabilidade dessas células em limpar a infecção (Magro; Crowson, 2000).

As membranas lipoproteicas das espiroquetas podem atuar na maior regulação da expressão de ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) nas células endoteliais, com a subsequente ligação dos linfócitos. A maior regulação de ICAM-1, VCAM-1 (Vascular cell adhesion) e E-selectina é uma recente propriedade atribuída ao antígeno 47-kDa do *T. pallidum* (Lee et al., 2000). A regulação dessas citocinas aliada à direta deposição de fibrina pode contribuir para a inflamação vascular encontrada na sífilis secundária. Embora os macrófagos e plasmócitos sejam predominantes nessas lesões, eles se apresentam ausentes ou escassos em 25% das lesões e são vistos em graus variáveis ao redor dos vasos nos outros 75% das lesões, sem particular predominância em relação aos outros tipos celulares (McCalmont; Macerenco, 2008). No entanto, quando presentes, os plasmócitos são úteis para o diagnóstico na medida em que auxiliam na diferenciação da sífilis para o líquen plano, psoríase e outras lesões de pele; além disso, um infiltrado inflamatório plasmocitário destaca uma resposta imune humoral na sífilis secundária. Uma variação na composição celular do infiltrado inflamatório reflete a duração e progressão da lesão com predominância de linfócitos nos primeiros dias, seguido pelo aumento da participação dos macrófagos e posterior formação de granulomas (Carlson et al., 2011).

O fator determinante para a duração das lesões é a habilidade das células inflamatórias em limpar o sítio da infecção dos microorganismos. Apesar de essa limpeza parecer ser realizada com grande eficiência na lesão primária, a reação imune parece ser menos eficiente na lesão secundária. Esse fato pode se dever a um número de razões, incluindo: (1) um grande número relativo de microorganismos presentes nas duas lesões e em outros sítios do corpo; (2) ineficiência de um sistema imune efetor; (3) mecanismos que começam a diminuir a resposta imune celular antes que todos os microorganismos sejam eliminados, levando a uma inflamação latente prolongada (Carlson et al., 2011). A proliferação do tecido

epitelial e a mudança do infiltrado inflamatório sugerem uma interação entre os mediadores inflamatórios na progressão das lesões. O *T. pallidum* diretamente aumenta a regulação das moléculas de adesão nas células endoteliais (Lee et al., 2000).

Apesar de muitos pacientes portadores de sífilis secundária não apresentarem sintomas sistêmicos, o restante dos pacientes exibem uma variedade de queixas e lesões que são sugestivas de infecção sistêmica e, usualmente gerais como febre, dor de garganta, dor de cabeça, perda de peso, náuseas, artrites, mialgia, hepatites, nefrites e vários sinais e sintomas neurológicos (Gaspari et al., 2008). Sintomas localizados quase sempre indicam inflamação focal em órgãos internos afetados (Carlson et al., 2011).

Cerca de 15 a 40% dos indivíduos não tratados irão desenvolver a sífilis terciária (Woods, 2005), ocorrendo envolvimento progressivo de múltiplos órgãos, principalmente os sistemas vascular e nervoso (Lautenschlager, 2006). É comum, também, nesse estágio o envolvimento ocular (Lynn; Lightman, 2004). A lesão clássica da sífilis terciária, a “goma”, provavelmente se forma como um resultado da ineficiência da reação de DHT, na forma de uma inflamação crônica granulomatosa, provavelmente em sítios de infecção persistente. Além disso, há uma destruição do tecido secundário levando à perda da função do nervo sensorial. O começo da sífilis terciária pode ocorrer a qualquer momento após a resolução da lesão secundária, sendo o período precoce entre dois anos e o período tardio entre dois e trinta anos (Carlson et al., 2011). As lesões terciárias em pele podem ser divididas entre nódulos e úlceras persistentes que podem ser semelhantes a diversas lesões como sarcoidose, psoríase e lupus eritematoso (Pereira et al., 2007), porém se diferencia das mesmas devido a presença dessa manifestação inflamatória granulomatosa (Hervier et al., 2009).

A “goma” é uma forma de granuloma formada quando a causa da inflamação não é facilmente removida ou inativada pelos macrófagos (Sell, 2001). Geralmente são solitárias e começam com um inchaço que pode ulcerar. Os macrófagos, algumas vezes multinucleares, presentes nos granulomas, exibem uma aparência epitelióide e contêm restos intracelulares com digestão incompleta. Essas células são, frequentemente, arranjadas em torno de uma zona necrótica central que podem conter microorganismos viáveis, separados do tecido ao redor. Em torno das células epitelioides existem números variados de linfócitos, plasmócitos e

macrófagos juntamente com fibroblastos e tecido conjuntivo, dependendo do estágio de progressão da lesão. Notam-se, ainda, artérias infiltradas por células inflamatórias e endarterites obliterantes (Carlson et al., 2011).

A sífilis congênita é causada pela infecção pelo *T. pallidum* adquirido da mãe não tratada ou com tratamento ineficaz. Muitas crianças com suspeita de sífilis congênita podem ser facilmente confirmadas através do teste sorológico feito pela mãe. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a sífilis materna é responsável por 460.000 abortos ou natimortos e 270.000 crianças com baixo peso ao nascer ou bebês prematuros, a cada ano (Herremans et al., 2010). A transmissão para o feto pode ocorrer em qualquer fase da gravidez e, ao mesmo tempo em que geralmente ocorre via placenta, pode acontecer durante o parto, caso as lesões genitais maternas estejam presentes. O risco de transmissão é reconhecido como sendo maior quando em conjunto com infecção materna recente e a falta de tratamento (Rawstron et al., 1993). As taxas estimadas de transmissão vertical em mulheres não tratadas são de 70 a 100% em sífilis primária, 67% em sífilis secundária, 40 a 83% para sífilis latente precoce e 10% em sífilis latente tardia (Bont et al., 1999; Hollier et al., 2001).

A sífilis congênita pode ser dividida em etapa precoce, em que o diagnóstico é realizado nos primeiros dois anos de vida, incluindo natimortos; e em etapa tardia em que o diagnóstico é realizado após os dois anos de idade e, usualmente, se manifesta próximo à puberdade, afetando principalmente os ossos, dentes e sistema nervoso (Chakraborty; Luck, 2008). Os sintomas clínicos variam entre prematuridade e baixo peso ao nascer (10 a 40%), hepatomegalia com ou sem esplenomegalia (33 a 100%), erupções cutâneas bolhosas (40%) e alterações ósseas vistas em radiografias (75 a 100%) (Chawla et al., 1988). O exame clínico é de extrema importância, porém, é estimado que acima de 60% dos recém-nascidos são assintomáticos ao nascimento (Lewis, 1992).

2.4 Sífilis e AIDS

Além da maior incidência de sífilis em pacientes com AIDS observa-se, também, um curso mais acelerado e severo da doença nesses pacientes com as

duas lesões (Ditzen et al., 2005). Podem-se notar manifestações secundárias não usuais que incluem múltiplas e severas ulcerações cutâneas e lesões semelhantes a micoses. Manifestações terciárias sistêmicas aparecem mais rapidamente após a manifestação secundária em pacientes com AIDS que aqueles sem a doença. Além disso, a transmissão da AIDS pode ser mais facilitada pela infecção por sífilis (Tobian; Quinn, 2009). Em geral, úlceras genitais causadas pelo *T.pallidum* são em maior número em pacientes HIV+ e servem, inclusive, como sítio de recepção da infecção (Tobian; Quinn, 2009).

Linfonodos de pacientes portadores de sífilis e infectados com HIV apresentam uma marcada hiperplasia interfolicular e folicular com proliferação vascular proeminente, plasmócitos, imunoblastos, macrófagos, destaque para células linfoplasmocitárias interfoliculares e neutrófilos ocasionais (Farhi et al., 1999). Além disso, a ativação da sífilis latente em indivíduos infectados pelo HIV parece coincidir com o desenvolvimento de depressão imunológica. Assim, a sífilis latente é mantida sob controle em indivíduos infectados pelo HIV que ainda não desenvolveram defeitos imunes, mas as lesões da sífilis terciária aparecem quando a resposta imune celular é deprimida. Com isso é suportada a hipótese de que a imunidade celular intacta é capaz de manter a latência e a depressão da imunidade celular resulta na expressão da sífilis terciária. Em adição a essa teoria, a produção de anticorpos pode ser afetada bem como os testes sorológicos para a sífilis podem ser falso negativos em pacientes com AIDS, apesar de *T. pallidum* ser demonstrável nos tecidos (Carlson et al., 2011).

2.5 Diagnóstico

Um grande ganho na compreensão clínica da sífilis foi o avanço de técnicas diagnósticas mais específicas. O uso da microscopia de campo escuro para identificação dos microorganismos através de fluidos e raspado das lesões foi primeiramente descrito em 1906 por Reichert. Já o primeiro teste sorológico confiável foi desenvolvido por Wassermann, no mesmo ano. Antes dessa data, o diagnóstico para sífilis dependia de um conjunto de observações clínicas com base no talento de médicos.

Métodos como a coloração por prata, imunofluorescência direta e imuno-histoquímica podem detectar facilmente espiroquetas em tecidos parafinados, especialmente quando os microorganismos são numerosos, como é o caso de cancros e lesões iniciais de sífilis secundária (Phelps et al., 2000; Hoang et al., 2004; Quatresooz; Piérard, 2009). Com a progressão da doença, esses métodos falham devido à escassez das espiroquetas. Em amostras de sangue, tecido e líquido, em fases mais tardias, o método da PCR é utilizado por ser mais sensível e específico na detecção da doença (Orle et al., 1996; Behrhof et al., 2008; Gayet-Ageron et al., 2009).

No quadro 2.1 pode-se observar a sensibilidade e especificidade dos estágios das lesões de sífilis de acordo com alguns métodos diagnósticos.

	% de Sensibilidade em cada estágio da infecção				% Especificidade
	Primária	Secundária	Latente	Terciária	
Testes não treponêmicos (Sorologia)					
VDRL	78	100	95	71	98
RPR	86	100	98	73	98
Testes treponêmicos (Sorologia)					
FTA-ABS	84	100	100	96	97
PCR	46	86	66	-	100
RT-PCR	28	36	0	-	100
Tecidos (pele, mucosa, exsudato)					
Microscopia de campo escuro	84	60	-	-	98
Coloração por prata (Dieterle, Steiner, Warthin-Starry)	86	40	-	4	-
Imunofluorescência direta	90 100	70 87	- -	- 36	- 100
Imuno-histoquímica	100	67	-	7	-
PCR (tecido)	94	80	-	-	98
PCR (esfregaço da lesão)	80	20	-	Dados não publicados	-
RT-PCR (esfregaço da lesão)					

Quadro 2.1 – Porcentagem de sensibilidade e Especificidade em Testes para lesões de Sífilis segundo Carlson e colaboradores (2011)

2.5.1 Sorologia

Devido ao fato da sífilis possuir manifestações clínicas semelhantes a outras lesões não-treponêmicas, testes laboratoriais são obrigatórios para o correto diagnóstico. Apesar de não haver um teste único e definitivo, a identificação do *T. Pallidum* por microscopia de campo escuro ou imunofluorescência direta ainda são considerados importantes para o diagnóstico (Park et al., 2011). Porém, a microscopia de campo escuro necessita de um profissional experiente e esse método não consegue distinguir, realmente, o *T. pallidum* patogênico de outras espiroquetas comensais. No caso da imunofluorescência, quando há utilização de soro policlonal, nota-se uma pouca especificidade (Magnarelli et al., 1987). Esses métodos requerem amostras obtidas a partir de lesões úmidas e precisam ser executadas por técnicos experientes (Ratnam, 2005). Alguns estudos defendem que a técnica da PCR e a técnica de Real-Time PCR, além de serem métodos caros, fornecem sensibilidade limitada para os estágios de sífilis secundária e latente (Larsen et al., 1995; Orle et al., 1996; Creegan et al., 2007; Gayet-Ageron et al., 2009; Heymans et al., 2010). Assim, os testes sorológicos ainda são amplamente utilizados para diagnóstico da sífilis devido aos razoáveis custos e familiaridade à prática clínica.

Os testes sorológicos para identificação de sífilis se dividem em 2 categorias: não-treponêmicos e treponêmicos. Todos os testes não-treponêmicos medem tanto a IgG (imunoglobulina IgG) quanto anticorpos antifosfolípicos IgM (imunoglobulina M) formados pelo hospedeiro, em resposta ao material lipóide liberado por células danificadas no início da infecção; e lipídica da superfície celular do treponema em si. Todos os testes treponêmicos utilizam *T. pallidum* ou seus componentes como antígeno (Ratnam, 2005).

Em alguns países, como os Estados Unidos e a Coréia, os testes não-treponêmicos são usados como testes de primeira linha para triagem de sífilis e os resultados positivos são, então, confirmados pelos testes treponêmicos. No entanto, essa estratégia pode deixar de diagnosticar corretamente casos de sífilis latente tardia e, assim, atrasar o diagnóstico. Neste aspecto alguns países, como Reino Unido e Alemanha, adotaram os testes treponêmicos como teste de triagem para

sífilis (Egglestone; Turner, 2000). Além disso, a sensibilidade dos testes treponêmicos, tais como o FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption), são reconhecidamente superiores aos testes não-treponêmicos (Ratnam, 2005).

Os critérios para o diagnóstico de sífilis são divididos em três estágios: definitivo, presuntivo e sugestivo (Centers for Disease Control and Prevention, 1991). Se o exsudato da lesão ou tecido está disponível, o exame direto é realizado, seguido por um teste não-treponêmico confirmado, depois, por um teste treponêmico. A confirmação do resultado do teste sorológico é indicativa da presença de anticorpos treponêmicos, mas não indica o estágio da doença e, dependendo do teste, não diferencia uma infecção recente de uma passada. A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos variam dependendo do tipo de teste e do estágio da doença (Ratnam, 2005).

No quadro 2.2 são descritas as principais aplicações e limitações dos testes diagnósticos nos diferentes estágios da sífilis.

Estágios	Testes recomendados	Comentários
Sífilis primária	Exame direto Testes não-treponêmicos Testes treponêmicos	Detecção de <i>Treponema pallidum</i> em lesões é prova definitiva de sífilis, mas um resultado negativo não exclui a sífilis. PCR nessa fase possui uma alta confiabilidade. Nas primeiras duas a três semanas, a sorologia pode não ser positiva na maioria dos casos, e na sífilis primária inicial, os testes treponêmicos são recomendados. Repetir sorologia entre em duas a doze semanas para afastar sífilis.
Sífilis secundária	Exame direto Testes não-treponêmicos Testes treponêmicos	<i>T. pallidum</i> pode ser detectado na pele e lesões nas mucosas, e testes baseados em PCR podem ser úteis para lesões atípicas. Os testes sorológicos têm quase 100% de sensibilidade. Em pessoas com história de sífilis, um aumento de quatro vezes no título fornece diagnóstico presuntivo da sífilis secundária.

Estágios	Testes recomendados	Comentários
Sífilis latente	Testes não-treponêmicos Testes treponêmicos	Testes não-treponêmicos são reativos em sífilis latente precoce, mas a sensibilidade diminui ao longo do tempo. Testes treponêmicos reativos na ausência de reatividade em testes não-treponêmicos requerem confirmação.
Sífilis terciária	Testes não-treponêmicos Testes treponêmicos	Até 30% das lesões podem não ser reativas em testes não-treponêmicos, enquanto os testes treponêmicos são quase sempre reativos. Portanto, os testes treponêmicos devem ser sempre considerados. As lesões não são adequadas para exame microscópico direto.
Neurosífilis	Testes não-treponêmicos Testes treponêmicos	O diagnóstico requer uma combinação de testes. VDRL-CSF é altamente específico, mas possui pouca sensibilidade. Portanto, um resultado VDRL negativo não exclui neurosífilis. FTA-ABS é mais sensível que VDRL-CSF, mas menos específico. Portanto, um teste CSF FTA-ABS pode ser útil para excluir neurosífilis. PCR nessa fase possui uma alta confiabilidade.
Sífilis congênita	Exame direto Testes não-treponêmicos	O diagnóstico requer uma combinação de testes. Sangue venoso da mãe e da criança devem ser testados. Testes sorológicos no soro infantil pode ser não reativos se a mãe tiver um título baixo ou foi infectada no final da gravidez. Testes de IgM específica são úteis para soro neonatal, mas resultados negativos não podem descartar a sífilis congênita. <i>T. pallidum</i> pode ser detectado pelo exame direto de uma variedade de amostras do recém-nascido. PCR nessa fase possui uma alta confiabilidade. Sífilis congênita assintomática requer uma abordagem abrangente.

Quadro 2.2 - Principais aplicações e limitações dos testes diagnósticos nos diferentes estágios da sífilis segundo Ratnam (2005)

2.5.2 Colorações

Os métodos usuais para detecção das espiroquetas no tecido, devido à sua rapidez e baixo custo, são as técnicas de coloração por prata como as de Levaditi, Steiner, Dieterle e Warthin-Starry que são bastante utilizadas na detecção de *T. pallidum*. Principalmente na técnica de Warthin-Starry, utiliza-se a coloração por prata para marcação das bactérias e sua detecção varia de 33 a 71% de sensibilidade (Hoang et al., 2004). No entanto, apesar da técnica de coloração por prata marcar as espiroquetas, não é específica para *T. pallidum*, marca bastante coloração de fundo na reação e, além disso, acaba por atingir fibras colágenas e dendritos dos melanócitos, levando a dúvidas na interpretação dos dados (Quatresooz; Piérard, 2009).

Métodos alternativos para a detecção dos microorganismos incluem a imunofluorescência e a imunoperoxidase, utilizados tanto em tecido fresco quando em parafinados. Hoang et al (2004) verificaram que a imuno-marcação com anticorpos monoclonais ou policlonais contra o *T. pallidum* é um método mais sensível e específico em comparação ao método de coloração por prata em tecidos parafinados de lesões de sífilis secundária. Os microorganismos, nessa técnica, são melhores visualizados devido a quase ausência de coloração de fundo.

No entanto, como é um método rápido e de baixo custo, a técnica de Warthin-Starry ainda é bastante utilizada (Martín-Ezquerria et al., 2009; Quatresooz; Piérard, 2009).

2.5.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é um método recente que permite a detecção das espiroquetas com altas taxas de sensibilidade e especificidade (Hong et al., 2004). Este método permite distinguir entre uma lesão atual de sífilis, de outra desordem de pele não relacionada à sífilis (Quatresooz; Piérard, 2009). Alguns estudos indicam uma maior sensibilidade da imuno-histoquímica quando comparada à técnica de Warthin-Starry, na proporção de 80% contra 50% da coloração (Martín-Ezquerria et al., 2009).

Outra vantagem da técnica de imuno-histoquímica é a identificação precisa da localização das espiroquetas. Elas se localizam, principalmente, nas camadas basal e supra-basal da epiderme e nas regiões perivasculares do tecido conjuntivo. Não se sabe, ao certo, a explicação para essa localização dos microorganismos, onde ele deve ser eliminado pelo sistema imunológico (Engelkens et al., 1993; Hoang et al., 2004). Alguns estudos mostram ainda que, em casos de sífilis secundária, a distribuição do *T. pallidum* ocorre principalmente no epitélio enquanto em casos de sífilis primária, essa localização se divide entre o epitélio adjacente à ulceração e tecido conjuntivo, ao redor dos vasos. Em ambos os estágios, as espiroquetas se apresentam intercelularmente (Martín-Ezquerria et al., 2009).

2.5.4 PCR

Tecnologias modernas de análise de DNA permitiram abordagens moleculares de diagnóstico que incluem PCR, análise de polimorfismos e sequenciamento de DNA para a caracterização de diversos patógenos. Como o *T. pallidum* não pode ser cultivado em meio artificial, essas técnicas modernas são extremamente importantes para complementar as técnicas laboratoriais já existentes para detecção de sífilis. Nas últimas duas décadas, inúmeros trabalhos utilizam a PCR na detecção de diferentes genes-alvo do *T. pallidum* (Hay et al., 1990; Burstain et al., 1991; Noordhoek et al., 1991; Wicher et al., 1992; Centurion-Lara et al., 1997; Liu et al., 2001). A maioria dos procedimentos utiliza espécimes obtidos de esfregaços de úlceras ou líquido cefalorraquidiano. Embora a pesquisa dos microorganismos em sangue total tenha sido relatada (Marfin et al., 2001; Sutton et al., 2001), é incerto definir em qual estágio da doença seria mais específico o diagnóstico da sífilis (Martin et al., 2009).

Relatos prévios mostram uma sensibilidade variando de 42 a 100% para a PCR (Wenhai et al., 2004; Kouznetsov et al., 2005), em que os valores mais baixos foram obtidos de amostras de tecidos parafinados. Apesar da desvantagem em se obter DNA de amostras parafinadas em relação a fluidos ou tecido fresco, estudos mostram que é possível se chegar a um diagnóstico preciso (Behrhof et al., 2008).

As fases da PCR ocorrem em temperaturas distintas, sendo elas descritas como: desnaturação (nesta fase o DNA dupla-fita é separado em DNA fita-simples); hibridização (ocorre o pareamento do primer com a fita molde); extensão (nesta fase, bases complementares são adicionadas a partir do primer pareado). Os ciclos são repetidos cerca de 30 a 40 vezes e a cada ciclo o produto é amplificado de modo exponencial (Hunt, 2008).

2.6 Tratamento

O tratamento de escolha para sífilis ainda é a penicilina benzatina e as doses recomendadas incluem para sífilis primária a quantidade de 2.400.000UI, IM, dose única. Em casos de sífilis secundária e latente recente, deve-se utilizar penicilina benzatina 4.800.000UI, IM, em duas doses semanais de 2.400.000UI. Em sífilis terciária e latente tardia, recomenda-se penicilina benzatina 7.200.000UI, IM, em três doses semanais de 2.400.000UI (Guia de controle das DST, 1999). O tratamento é eficaz, embora possam ocorrer taxas de insucesso, por isso recomenda-se que o paciente refaça os exames sorológicos pelos seis a doze meses seguintes e retratar caso o tratamento anterior tenha sido inadequado (Salata, 2002; Scott; Flint, 2005). A penicilina age interferindo na síntese do peptidoglicano, componente da parede celular do *T. pallidum*. O resultado é entrada de água no treponema, o que acaba por destruí-lo (Avelleira; Bottino, 2006).

No tratamento da neurosífilis a droga escolhida é a penicilina cristalina pela capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. A dose recomendada varia de 3 a 4.000.000UI, por via endovenosa, de quatro em quatro horas, no total de 18 a 24.000.000UI/dia por 10 a 14 dias (Center for Disease Control and Prevention, 2002).

Os pacientes HIV+ têm mais insucesso nos tratamentos e por isso precisam de um acompanhamento maior (Mitchell et al., 2006). Em caso de alergia à penicilina, o tratamento pode ser substituído por doxicilina ou tetraciclina (Scott; Flint, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Objetivos Gerais

1. Foi realizado um levantamento retrospectivo junto ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP, dos casos de lesões orais submetidos a exame anátomo-patológico, cujo diagnóstico histológico foi de suspeita de sífilis, no período de janeiro a dezembro de 2011;
2. De todos estes casos com diagnóstico suspeito de sífilis, foram realizadas reações imuno-histoquímicas para pesquisa *do T. pallidum*, com o objetivo de confirmar ou não a suspeita de sífilis;
3. Nos mesmos casos foi utilizado o método de coloração por prata para comparação da forma mais eficaz de marcação dos microorganismos.

Objetivos específicos

1. Foram avaliados os resultados que tenham tido a hipótese confirmada e analisados os aspectos epidemiológicos, clínicos e histológicos presentes.
2. Foram comparados o perfil de marcação imuno-histoquímica, histoquímica e características histológicas das lesões, com os valores dos testes sorológicos dos pacientes.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO

4.1. Seleção de pacientes

Para a seleção da casuística foi realizado um levantamento de todos os casos diagnosticados histologicamente como suspeitos de sífilis, pertencentes ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP, utilizando-se o programa Laudo & Imagem onde os laudos estão cadastrados, de um total de 70000 biopsias. O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e aprovado sob o número 35 (Anexo A).

4.2 Material e método

Foram levantados 34 casos e todos eles foram submetidos à pesquisa da bactéria *Treponema pallidum*, através das técnicas da imuno-histoquímica e histoquímica.

Dos casos positivos para o *Treponema pallidum*, foi possível obter-se a avaliação sorológica de 9 casos.

Em todos os casos em que foi possível, esses valores foram comparados aos aspectos histológicos e às marcações imuno-histoquímica e histoquímica, para determinação da forma mais eficaz de identificação.

Como controles positivos foram utilizados casos confirmados por exames sorológicos.

Como controle negativo foi escolhido um diagnóstico, ao acaso, para realização dos testes e verificação da não marcação do microorganismo.

4.2.1 Estudo Histopatológico

Para o estudo histopatológico, do material previamente fixado em formol a 10% e incluído em parafina, foram obtidos cortes de 5µm que foram processados da maneira usual para coloração com hematoxilina e eosina.

4.2.2 Estudo Histoquímico

Foram utilizados cortes de 6 µm obtidos do material fixado em formol a 10% e incluídos em parafina e utilizado o método de Warthin-Starry de coloração por prata das espiroquetas, seguindo o protocolo, de Serapião e Silva (1980):

1. Desparafinização e hidratação;
2. Impregnação na solução de Nitrato de Prata a 1% (preparada em água tamponada) na estufa a 60°C por uma hora;
3. Lavagem rápida em água bi-destilada ou deionizada;
4. Revelação na solução Hidroquinona/Gelatina/Nitrato de Prata (ABC) até os cortes ficarem castanho dourado, de 3 a 4 minutos (ver preparo abaixo);
5. Lavagem em água tamponada por 3 minutos;
6. Desidratação, diafanização e montagem.

SOLUÇÕES TAMPÃO

1 - Água Tamponada pH 3,6

Acetato de Sódio.....16,4 g

Água destilada.....1000,0 ml

2 - Ácido Acético Glacial 11,8%

Água destilada.....100,0 ml

Ácido Acético Glacial.....11,8 ml

Preparação da solução tamponada pH 3,6:

Solução-1.....3,0 ml

Solução-2.....37,0 ml

Água destilada: 960,0 ml

3 - Nitrato de Prata 1%

Nitrato de Prata.....1,0 g

Água destilada.....100,0 ml

A - Hidroquinona 3%

Hidroquinona.....0,3 g

Água Tamponada.....10,0 ml

B - Gelatina 5%

Gelatina neutra.....5,0 g

Água destilada.....100,0 ml

C - Nitrato de Prata 2%

Nitrato de Prata.....0,5 g

Água destilada.....25,0 ml

Manter somente a solução de Nitrato de Prata na estufa 60-65°C e as soluções foram misturadas na ordem:

Solução Hidroquinona (A).....4 ml

Solução Gelatina (B).....60 ml

Solução de Nitrato de Prata (C)..12 ml

4.2.3 Estudo Imuno-histoquímico

Do material emblocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3 µm de espessura, que foram dispostos em lâminas de vidro (26mm x 76mm), previamente silanizadas. Após essa etapa, as lâminas seguiram para uma estufa a 60°C, permanecendo um tempo estimado de 24 hs. A seguir, foi realizada a desparafinização em dois banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%) durante 5 minutos cada. Após a reidratação, foi realizada a remoção do pigmento formólico através de incubação em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95%

durante 10 minutos. Após essa etapa, seguiu-se lavagem em água destilada. Não houve necessidade de recuperação antigênica segundo a indicação do fabricante. A seguir foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, em solução de peróxido de hidrogênio a 20V e metanol (1:1), em 2 banhos por 15 minutos cada. Logo após foi realizada 2 lavagens em água destilada por 10 minutos cada e tamponamento com 1 banho de TRIS pH 7,6, por 10 minutos.

Seguiu-se, então, a incubação com o anticorpo primário (Anti-treponema, Biocare medical) que foi diluído em BSA na proporção 1:100, conforme otimização prévia. A solução foi colocada sobre os cortes permanecendo por 1 hora. Após essa etapa, os cortes foram novamente lavados 3 vezes com TRIS, por 5 minutos cada e incubados por 30 minutos com a solução biotinilada Link Universal (Anticorpo secundário). Depois desse tempo, foram realizadas mais 3 lavagens com TRIS, 5 minutos cada. Após esta etapa, seguiu-se a incubação com a solução Streptavidin-HRP (Anticorpo terciário) por mais 30 minutos e depois novamente lavados 3 vezes com TRIS, por 5 minutos cada.

Todas as reações foram reveladas pelo sistema cromógeno DAB (DAKO, #k3468), por um tempo de 10 minutos, que produz um precipitado acastanhado e torna a imunorreação visível ao microscópio de luz. Finalizada esta etapa, os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer por 10 minutos (LAFAN # 15772), lavados em imersões de água, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III), diafanizados em 2 banhos de xilol (5 minutos cada) e montados manualmente.

5 RESULTADOS

O número de casos que tiveram, em algum momento, a suspeita de quadros de sífilis, contabilizou 34. As hipóteses clínicas variaram entre: histoplasmose, infecção viral, sarcoma, neurilemoma, linfoma, pênfigo vulgar, penfigóide, carcinoma, líquen plano erosivo, e tuberculose. Apenas em 1 caso a suspeita de sífilis foi aventada.

Os laudos histopatológicos dos casos suspeitos de sífilis foram liberados, pelo serviço Anátomo-patológico da FOUSP, como processo inflamatório crônico inespecífico rico em plasmócitos, processo inflamatório crônico granulomatoso ou processo inflamatório crônico e agudo com predominância plasmocitária, com uma nota de que a possibilidade de sífilis ou de um processo infeccioso deveria ser investigada.

Os 34 casos foram submetidos a análises histoquímicas e imuno-histoquímicas e, depois, obtidos os dados sorológicos para verificação da eficiência dos métodos.

5.1 Caracterização da amostra

Do total de 34 casos, 13 tiveram confirmação da presença do *Treponema* por imuno-histoquímica (100%) ou histoquímica (46,15%). As características clínico-epidemiológicas dos 13 pacientes, que tiveram confirmação de diagnóstico de sífilis, por qualquer um dos métodos, estão apresentadas no quadro 5.1.

A análise das amostras referentes a esses pacientes revelou um predomínio de indivíduos do gênero masculino (84,6% n=11) com relação ao feminino (15,3% n=2). A idade média da população estudada foi de 42,53 observando-se uma idade mínima de 28 anos e idade máxima de 54 anos. Com relação à duração da lesão clínica, nota-se que 1 mês foi a de maior prevalência percebida pelos pacientes (53,84% n=7). Quanto ao sítio anatômico predominante, dos dados obtidos, encontra-se a mucosa labial (50% n=6), seguido de língua (38,4% n=5).

Número de pacientes	Gênero	Idade	Duração	Localização
1	M	51	Não informado	Lábio superior e inferior
2	M	45	1 mês	Lábio inferior
3	M	45	1 mês	Dorso de língua
4	M	46	1 mês	Dorso de língua
5	M	45	3 meses	Mucosa jugal
6	M	45	3 meses	Palato duro
7	M	42	1 mês	Lábio inferior
8	F	28	1 mês	Lábio inferior
9	F	28	1 mês	Dorso de língua
10	M	41	2 meses	Lábio superior
11	M	54	2 meses	Lábio inferior
12	M	46	4 meses	Borda lateral de língua
13	M	37	1 mês	Borda lateral de língua

M: gênero masculino; F: gênero feminino.

Quadro 5.1 – Dados clínicos dos casos confirmados para Sífilis

Com relação à etnia dos pacientes, nota-se uma prevalência da etnia branca, contabilizando 100% dos casos analisados. Quanto à hipótese diagnóstica sugerida pelos profissionais, pode-se observar uma variedade de lesões sugeridas e apenas 1 caso onde foi levantada a hipótese de Sífilis (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Dados relativos a predomínio de etnia e principais hipóteses diagnósticas

Número dos casos	Raça	Hipóteses diagnósticas
1	Branca	Histoplasmose
2	Branca	Infecção viral
3	Branca	Infecção viral
4	Branca	Neurilemoma
5	Branca	Linfoma
6	Branca	Linfoma
7	Branca	Úlcera com bordas endurecidas
8	Branca	Pênfigo vulgar x Penfigóide

Número dos casos	Raça	Hipóteses diagnósticas
9	Branca	Pênfigo vulgar x Penfigóide
10	Branca	Liquen Plano Erosivo
11	Branca	Sífilis
12	Branca	Leucoplasia x Eritroplasia x CEC
13	Branca	Úlcera x CEC x Fibrossarcoma

5.2 Características clínicas e histopatológicas

Com relação às informações clínicas levantadas de todos os casos, nota-se que a característica clínica mais comum entre todas as lesões é a presença de úlcera ou erosão (76,9% n= 10), ocorrendo apenas um caso de descrição clínica como placa branca, concomitante à úlcera e outro único caso com descrição clínica de nódulo. (Figura 5.1). Não se sabe ao certo quantos pacientes eram HIV+, mas na figura 5.2 nota-se imagem clínica de paciente infectado pelas duas doenças, concomitantemente.

Já na figura 5.3 nota-se imagem de alguns dos casos, apresentando manifestações em pele, típico de sífilis secundária e na figura 5.4 pode-se observar as diversas manifestações clínicas da sífilis secundária, situando-se em áreas diversas.

Figura 5.1 – Lesões de sífilis secundária em mucosa oral. Nota-se a presença de áreas erosivas e ulceradas em mucosa jugal (A), úlcera em dorso de língua (B), nódulo ulcerado em dorso de língua (C) e áreas erosivas permeadas por placas esbranquiçadas em palato (D)

Figura 5.2 - Paciente portador de sífilis e infectado pelo vírus HIV. Nota-se a presença de áreas ulceradas em lábio inferior (A) e dorso de língua (B)

Figura 5.3 – Lesões de sífilis secundária, com comprometimento da pele em regiões de mãos formando áreas descamativas (A), tronco (B), pescoço (C) e áreas de placas esbranquiçadas em mão (D)

Figura 5.4 – Diversas formas clínicas de lesões de sífilis em forma de placas mucosas e erosões

Quanto às características histopatológicas, há presença de ulcerações (62,6% n=9) e nota-se que, no epitélio presente, há uma intensa exocitose de leucócitos (66,6% n=8) e de neutrófilos (16,6% n=2) (Figura 5.5). No tecido conjuntivo, observa-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório mononuclear, formando por vezes granulomas imaturos, além de predominância de plasmócitos (100% n=13), tanto justaepitelial quanto perivascular profundo (Figura 5.6).

Figura 5.5 - Corte de mucosa evidenciando áreas de ulceração e intenso infiltrado inflamatório difuso na lâmina própria em aumento de 100 X (A) e área histológica evidenciando intensa exocitose em tecido epitelial (B) (HE 400 X)

Figura 5.6 – Aspecto histológico de lesões de sífilis em mucosa oral. Em (A) visão panorâmica de corte de mucosa mostrando intenso infiltrado inflamatório justaeptelial e perivascular; em maior aumento nota-se a presença de intenso infiltrado inflamatório justaeptelial (B). Observa-se a predominância plasmocitária no infiltrado perivascular (C) e também no infiltrado difuso (D)

No quadro 5.2 observam-se as principais características clínicas e histopatológicas.

Número de pacientes	Característica clínica	Características histopatológicas
1	Não informado	Epitélio paraqueratinizado exibindo edema e exocitose, intenso infiltrado inflamatório com predominância de plasmócitos, principalmente perivascular.
2	Úlcera e erosão	Pequena quantidade de tecido epitelial hiperparaqueratinizado, com atrofia, áreas de ulceração, intenso infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente plasmocitário, formando granulomas imaturos.
3	Úlcera e erosão	Hiperplasia epitelial, com áreas de exocitose, microabscessos, áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico com predominância de plasmócitos e granulomas imaturos.
4	Úlcera e erosão	Epitélio com acantose, espongiose, exocitose e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório com predominância de plasmócitos e macrófagos, com organização semelhante a granulomas.
5	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, com acantose, espongiose, edema, intensa exocitose e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico e agudo, principalmente plasmocitário, perivascular e profundo. Áreas hemorrágicas.
6	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, com acantose, espongiose, edema, intensa exocitose e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico e agudo, principalmente plasmocitário, perivascular e profundo. Áreas hemorrágicas.
7	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, com exocitose, espongiose, degeneração hidrópica e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico com predominância de plasmócitos, arranjados em forma de granulomas imaturos. Áreas hemorrágicas.
8	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, com exocitose de leucócitos e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico com predominância de plasmócitos.
9	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, com intensa exocitose. Intenso infiltrado inflamatório principalmente plasmocitário.
10	Úlcera e erosão	Epitélio paraqueratinizado, exibindo áreas de acantose, intensa exocitose. Intenso infiltrado inflamatório crônico com predominância de plasmócitos justaeptelial e perivascular profundo.

Número de pacientes	Característica clínica	Características histopatológicas
11	Úlcera e erosão	Hiperplasia epitelial, epitélio paraqueratinizado, intensa exocitose de neutrófilos e áreas de ulceração. Intenso infiltrado inflamatório crônico e agudo, principalmente plasmocitário.
12	Úlcera; Placa branca	Epitélio paraqueratinizado exibindo atrofia e exocitose neutrofílica, intenso infiltrado inflamatório rico em plasmócitos. Áreas hemorrágicas.
13	Nódulo	Epitélio paraqueratinizado exibindo áreas de ulceração, infiltrado inflamatório crônico e agudo justaeptelial e perivascular, principalmente plasmocitário.

Quadro 5.2 - Características clínicas e histopatológicas de todos os casos que tiveram suspeita de sífilis confirmada.

5.3 Características histoquímicas

Com relação à análise histoquímica, em que foi feita coloração por prata de Warthin-Starry, nota-se uma dificuldade na visualização dos treponemas devido à grande deposição de prata nos treponemas, em fibras colágenas e pelo fundo da reação, principalmente quando o microorganismo se encontra localizado em tecido conjuntivo. Quando há abundância de *T. pallidum* apenas no epitélio, o microorganismo é melhor visualizado (Figura 5.7). Dos 13 casos, apenas 6 tiveram marcação positiva para coloração de Warthin-Starry (46,15%).

Figura 5.7 - Coloração para Warthin-Starry marcando áreas basais e supra-basais de epitélio em um aumento de 100 X (A) e em um aumento de 400X (B). Observa-se, ainda a marcação das espiroquetas de *Treponema pallidum* em aumento de 400X (C) e 1000X (D)

5.4 Imuno-histoquímica

As colorações imuno-histoquímicas foram feitas com o anticorpo anti-*treponema pallidum* (Biocare medical; Source: Rabbit polyclonal). As reações passaram por padronizações de concentração de anticorpo (1:50, 1:100, 1:200 e 1:500) e por tipos de tratamento para recuperação antigênica (Sem tratamento, Ácido cítrico ph 6,0, Tris-EDTA ph 9,0 e EDTA ph 8,0) para verificar a melhor maneira de visualização dos microorganismos. As melhores reações coincidiram com as informações fornecidas pelo fabricante, com ausência de tratamento para recuperação antigênica e na diluição de 1:100. O anticorpo foi incubado por 1 hora e todas as reações foram feitas utilizando controle positivo, confirmado pela sorologia, e controle negativo, através de lesão não infecciosa.

Todos os 13 casos positivos tiveram marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-treponema. Essa marcação mostrou uma predileção pelo epitélio (61,5% n=8), o que inclui os pacientes com lesões múltiplas, seguido de marcação em epitélio e conjuntivo (27,3% n=3) e apenas marcação em tecido conjuntivo (18,2% n=2). Os resultados podem ser visualizados pela figura 5.8 e, em maior aumento, pela figura 5.9.

Figura 5.8 - Marcação imuno-histoquímica do *Treponema pallidum* em tecido epitelial (A), (B), (C), e marcação em tecido epitelial e conjuntivo (D). (Estreptoavidina-biotina, 400 X)

Figura 5.9 - Nota-se a marcação imuno-histoquímica para *T. pallidum*, evidenciando a forma em espiroqueta da bactéria (Estreptoavidina-biotina, 1000 X)

5.5 Testes sorológicos

De posse das marcações histoquímicas e imuno-histoquímicas das lesões com suspeita de sífilis, foram coletados os dados sorológicos da maioria dos pacientes, para confirmação do quadro. Segundo os cirurgiões-dentistas responsáveis pelos pacientes, em 12 casos houve sorologia positiva e, em 1 dos casos, o cirurgião-dentista recebeu a informação da suspeita de sífilis e ainda não havia pedido a sorologia ao paciente. Segundo informações, a maioria dos casos apresentou falso-negativo no primeiro exame de VDRL e em um caso, o exame só foi positivo depois da terceira tentativa. Em alguns dos casos mais recentes, foram realizadas reações imuno-histoquímicas para o anti-treponema e os pacientes receberam o laudo de lesão compatível com sífilis antes do resultado positivo para sorologia.

Segundo profissionais, os dados da sorologia de muitos pacientes não foram obtidos devido à evasão desses depois do pedido do exame.

Os resultados das marcações histoquímicas, imuno-histoquímicas e os dados sorológicos obtidos estão evidenciados no quadro 5.3.

Casos confirmados	Marcação histoquímica	Marcação imuno-histoquímica	Sorologia
1	+	+	Não informado
2	—	+	VDRL: reagente ate 1/256
3	—	+	VDRL: reagente ate 1/256
4	+	+	RPR: 1/32
5	+	+	Não informado
6	—	+	Não informado
7	+	+	VDRL: reagente 1/128
8	—	+	RPR: 1/16
9	—	+	RPR: 1/16
10	+	+	VDRL: reagente 1/128

Casos confirmados	Marcação histoquímica	Marcação imuno-histoquímica	Sorologia
11	+	+	VDRL: reagente 1/128
12	-	+	VDRL: reagente 1/256
13	-	+	Não solicitado

Quadro 5.3 – Resultados das marcações histoquímicas, imuno-histoquímicas e dados sorológicos dos casos confirmados

6 DISCUSSÃO

Embora a sífilis seja uma doença datada de muitos anos, hoje é considerada uma doença reemergente, particularmente no Ocidente, com uma estimativa de 10 a 12 milhões de novos casos a cada ano (French, 2007). Sua importância também está nas altas taxas de morbidade e na capacidade de ser um facilitador para a transmissão do vírus HIV (Tobian; Quinn, 2009).

No presente trabalho a sífilis foi mais frequente em indivíduos da etnia branca e quase 84,6% dos indivíduos eram do gênero masculino, o que corrobora com os dados encontrados na literatura. No entanto, a média de idade encontrada no trabalho, que foi de 42,56%, se situa acima do esperado, que seria de 35 anos (Ashton et al., 2003).

A lesão primária de sífilis caracteriza-se pela presença do cancro, uma lesão indolor, que cicatriza espontaneamente e, apenas de 30 a 40% dos pacientes são diagnosticados nessa fase (Lynn; Lightman, 2004; Scott; Flint, 2005; Walker; Walker, 2007). Os estudos mostram divergência quando discutem a incidência da lesão primária da sífilis em sítios extragenitais. Carlson e colaboradores, em 2011, citam essa incidência em 20%, Barrett (2004) fala em 10% e Ramoni e colaboradores (2009) defendem que, pelo menos, 5% das lesões primárias ocorrem em outras regiões que não sejam as genitálias. Estudos mostram a transmissão da sífilis por outros meios que não o contato sexual principalmente em crianças e profissionais da saúde, incluindo cirurgiões dentistas, e, regiões extragenitais têm sido citadas para o aparecimento do cancro como dedos, nariz, pálpebra, braço e mamilo (Lee et al., 2006), embora sejam extremamente raros.

No presente estudo, segundo dados dos profissionais responsáveis, nenhum caso era de sífilis primária, o que mostra uma dificuldade de diagnóstico e tratamento das lesões orais nesse estágio devido à falta de sintomatologia e ao desaparecimento em poucas semanas, concordando com os dados da literatura.

O estágio secundário possui uma sintomatologia mais evidente e o aparecimento de lesões bucais é mais comum, acometendo de 30 a 50% dos pacientes (Bruce; Rogers, 2004). As lesões mais comuns nesse estágio são as placas mucosas que se apresentam na forma de úlceras e erosões e acometem, principalmente, lábios, mucosa jugal, língua, palato, úvula, amígdalas e faringe posterior (Leão et al., 2006; Mullooly; Higgins, 2010). Nesse estudo, todas as

manifestações bucais ocorreram no estágio secundário. Todos os casos em que tivemos acesso às informações foram descritos como úlceras e erosões e, apesar de não haver descrição detalhada das lesões, sugere-se que sejam as placas mucosas, pelo aspecto ulcerado ou erosivo. Dos pacientes avaliados nesse estudo, os locais mais acometidos foram os lábios (50%), seguido da língua (38,4%), o que corrobora com os locais mais comuns encontrados na literatura.

É nessa fase, também, que a sífilis é conhecida como o “grande imitador”, por manifestar lesões semelhantes a infecções não treponêmicas (Carlson et al., 2011). Nos dados avaliados nesse trabalho, há uma concordância com esses relatos, visto que as hipóteses diagnósticas dos cirurgiões dentistas foram bem diversificadas, variando entre infecções fúngicas, virais, tumores benignos e malignos e desordens imunomediadas.

Apesar da atuação da resposta imune que resulta na eliminação local do *Treponema pallidum* em estágios primários e secundários, esses microorganismos continuam presentes em tecidos sem causar qualquer tipo de sinais ou sintomas. A esse estágio dá-se o nome de sífilis latente. Apesar da transmissão sexual nessa fase ser rara, pode ocorrer transmissão ao feto em desenvolvimento (Ho; Lukehart, 2011). Evidências recentes sugerem que, nessa fase, o *T. pallidum* é capaz de iludir a resposta imune através da variação antigênica das proteínas da superfície bacteriana, resultando em resistência à fagocitose dos seletos treponemas que sobreviveram à resposta imune na lesão primária (Shaffer et al., 1993).

Em alguns indivíduos, a infecção latente se reativa avançando para a fase de sífilis terciária depois de anos ou décadas e, então, acomete vários órgãos. Manifestações podem incluir granulomas, que afetam 15% dos pacientes com sífilis não tratados; alterações cardiovasculares, que podem resultar em insuficiência da aorta ou aneurismas e acometem 10% dos pacientes sem tratamento; e neurosífilis, reconhecida em 6,5% dos pacientes que não passaram por nenhum tipo de tratamento. Atualmente, a sífilis terciária é raramente vista, em grande parte pelo tratamento eficaz, além da baixa virulência do *T. pallidum* (Lafond; Lukehart, 2006). No presente estudo, não houve nenhum caso relativo à sífilis terciária. No entanto, em um dos casos, o paciente já havia sido cometido pela doença, foi tratado e, na repetição dos exames sorológicos para RPR, o título foi de 1:1.

A transmissão vertical da sífilis permanece um grande problema de saúde pública no Brasil e ocorre através da disseminação hematogênica do *Treponema*

pallidum da gestante infectada não-tratada ou inadequadamente tratada para o seu conceito, por via transplacentária. A transmissão pode ocorrer em qualquer fase gestacional ou estágio clínico da doença materna e ocorre aborto espontâneo, natimorto ou morte perinatal em aproximadamente 40% das crianças infectadas a partir de mães não-tratadas. Acreditava-se que a infecção do feto a partir da mãe com sífilis não ocorresse antes do 4º mês de gestação, entretanto, já se constatou a presença de *T. pallidum* em fetos, a partir da 9ª semana de gestação. (Brasil, 2005).

De acordo com a vigilância epidemiológica, um caso de sífilis congênita será considerado caso preencha alguns dos quatro critérios citados abaixo, conforme Brasil (2005):

1. Qualquer criança, aborto ou natimorto de uma mãe com evidências clínicas de sífilis ou testes não treponêmicos negativos, sem a confirmação de testes treponêmicos, realizada durante o período pré-natal ou durante trabalho de parto ou curetagem, que não tenha sido tratada ou recebeu tratamento inadequado.
2. Qualquer indivíduo com menos de 13 anos de idade com as seguintes sorologias: titulação ascendente de testes não treponêmicos; testes não treponêmicos reagentes após 6 meses de idade (exceto em situações de acompanhamento terapêutico); testes treponêmicos reativos após 18 meses de idade; testes não-treponêmicos maiores que os da mãe.
3. Qualquer indivíduo mais jovem que 13 anos, com teste não-treponêmico reativo, evidências clínicas, no liquor ou radiológica de sífilis congênita.
4. Qualquer situação de evidência de infecção pelo *T. pallidum* na placenta ou cordão umbilical e amostra da lesão, biópsia ou necropsia de criança, aborto de natimorto.

A maioria dos casos de sífilis ocorre entre homossexuais sendo, mais da metade, indivíduos HIV+ (Centers for Disease Control and Prevention, 2005; Ditzen et al., 2005), com relatos de taxa entre 15 e 37% (Ashton et al., 2003). Estudos mostram que a incidência de sífilis em pacientes HIV+ é 77 vezes maior que na população geral (Chesson et al., 2005). Alguns estudos relatam que as manifestações bucais são mais exacerbadas nesse tipo de paciente, principalmente quando se trata de sífilis secundária (Lynn; Lightman, 2004). No entanto, artigos

recentes discutem que não está completamente claro se a co-infecção do vírus HIV agrava as manifestações clínicas em pacientes com sífilis precoce e neurosífilis, apesar das anormalidades clínicas e do líquido cefalorraquidiano serem mais comuns em indivíduos infectados pelo HIV com células T CD4+ com contagem igual ou inferior a 350 células/ml (Ghanem et al., 2009).

Enquanto as conseqüências a longo prazo da infecção da sífilis no prognóstico de indivíduos infectados pelo vírus HIV não são conhecidas, estudos prospectivos sugerem que, apesar de aumentos transitórios de linfócitos T CD4 + e cargas virais, a sífilis não pareceu afetar a progressão do paciente HIV+ (Weintrob et al., 2010). A co-infecção de *T. pallidum*, possui impacto prejudicial sobre o estado imunológico e virológico em infectados pelo HIV, o que pode melhorar com o tratamento da sífilis, embora esses dados sejam conflitantes (Palacios et al., 2007).

Em se tratando da histologia, as descrições histológicas em lesões orais de sífilis são escassas, provavelmente devido à raridade em se biopsiar essas lesões, já que os exames de escolha são o clínico e o sorológico e as biópsias ocorrem apenas quando há um diagnóstico sem suspeita de sífilis (Barrett et al., 2004).

Histologicamente, uma das características mais importantes é a presença de um infiltrado plasmocitário, pelo menos em lesões primárias e secundárias. Em pele, a presença de plasmócitos é rara e, quando presentes, aumentam a suspeita de sífilis, principalmente com uma distribuição perivascular (Barrett et al., 2004). Essas células, no entanto, são mais comumente vistas em biópsias da cavidade oral, principalmente em região de gengiva e, é a sua presença em abundância, que nos permite pensar em sífilis como diagnóstico diferencial histológico de outras lesões.

Na sífilis primária, nota-se a presença de ulcerações, casos isolados de exocitose, endarterites, neurites, algumas células endoteliais proeminentes e alguns vasos sanguíneos dilatados (Barrett et al., 2004, Martín-Ezquerria et al., 2009). Observa-se a presença de um tecido epitelial exibindo acantose ao lado das áreas ulceradas ou erodidas e, logo abaixo, um infiltrado inflamatório com predominância de linfócitos e macrófagos. Nas margens da lesão, a inflamação se torna menos densa e consiste em um arranjo perivascular de mononucleares. Já as células endoteliais se apresentam com inchaço sem, necessariamente, haver evidências de vasculites ativas (Carlson et al., 2011).

Na sífilis secundária, as características histológicas são mais variadas e apresentam alterações tanto no tecido epitelial quanto no tecido conjuntivo com

densidades de células inflamatórias variadas, como plasmócitos e neutrófilos (Ackerman, 1985). A característica mais comum é a presença de um infiltrado inflamatório crônico em banda e perivascular profundo. Além disso, números variáveis de queratinócitos necróticos, paraqueratose e intensa exocitose são visualizados (Carlson et al., 2011; Martín-Ezquerria et al., 2009). Jeerapaet; Ackerman (1973) descreveram uma série de características histológicas comuns à sífilis secundária em pele: dilatação dos vasos sanguíneos (96%), inchaço de células endoteliais (96%), hiperplasia epitelial (85%), infiltrado inflamatório justaeptelial (85%), presença de plasmócitos (85%), infiltrado inflamatório superficial e profundo (82%), edema (78%), paraqueratose focal (63%), extravasamento de células vermelhas do sangue (63%), queratinócitos necróticos (56%), presença de neutrófilos no tecido conjuntivo (44%) e dispersos na epiderme (37%), espongiose (26%), infiltrado inflamatório apenas superficial (18%), eosinófilos presentes (18%) erosão epitelial (15%) e ulceração (4%).

As características histológicas encontradas no nosso estudo incluem áreas de presença de plasmócitos em 100%, hiperqueratose em 84,6%, exocitose em 76,9%, erosão ou úlcera em 62,6% dos casos, infiltrado inflamatório perivascular em 38,4%, extravasamento de células vermelhas do sangue em 30,7% espongiose em 30,7%, edema em 23%, infiltrado inflamatório justaeptelial em 15,3%, presença de neutrófilos em tecido epitelial em 15,3%, e hiperplasia epitelial em 7,6% dos casos. Todos os dados do nosso estudo quando comparados à literatura, mostram discrepâncias, por vezes com grandes intervalos. Parte da explicação dessa diferença se deve ao fato da amostra desse trabalho ser menor que a amostra de casos em pele encontrados na literatura. Outra explicação, de grande importância, é o fato de que os dados histológicos relativos à sífilis secundária são, em sua maioria, em casos de biópsias de pele. O nosso trabalho demonstra apenas alterações encontradas em biópsias de mucosa oral.

Barrett et al (2004) demonstraram alterações histológicas apenas em lesões de mucosa oral, totalizando 5 casos. Porém, 2 casos eram relativos à sífilis primária, 2 casos de sífilis terciária e apenas 1 caso de sífilis secundária. Os dados descritos nesse estudo em relação ao único caso de sífilis secundária mostram uma hiperplasia epitelial não usual, muita presença de plasmócitos, endarterites, neurites e maior quantidade de espiroquetas em relação aos estágios primário e terciário. Nosso estudo descreve 13 casos, todos de mucosa oral, referentes à sífilis

secundária apenas. Para comparação aos dados encontrados por Barrett et al (2004), nosso estudo não apresenta casos de endarterites e neurites, bem como há hiperplasia epitelial em apenas 1 dos casos.

Treponema pallidum em tecidos fixados com formol é classicamente identificada através de colorações por impregnação de prata. No entanto, ao avaliar as marcações das espiroquetas as dificuldades muitas vezes surgem devido, principalmente, a coloração de fundo inespecífica, a presença de elementos do tecido (ou seja, as fibras reticulares e grânulos de melanina) e à deposição de prata nas próprias espiroquetas, que podem dar origem a resultados falso-positivos ou falso-negativos (Martín-Ezquerro et al., 2009).

No presente trabalho, apenas 46,15% dos casos submetidos à coloração pela prata, foram positivos. Esses dados estão de acordo com estudos prévios que mostram uma sensibilidade da técnica de Warthin-Starry entre 33 a 71% (Lee et al., 1991; Engelkens et al., 1993).

A imuno-histoquímica na detecção do *T. pallidum* aumenta a sensibilidade e especificidade (Lee et al., 1991; Hoang et al., 2004). Alguns estudos relatam uma sensibilidade variando entre 74 e 94% para a análise imuno-histoquímica (Lee et al., 1991; Hoang et al., 2004). A distribuição histopatológica e número de espiroquetas em lesões mucocutâneas da sífilis foram avaliados em vários estudos (Lee et al., 1991; Engelkens et al., 1993). Considera-se que *T. pallidum*, pode ser detectado, em grande número, em lesões de pele apenas durante as fases primária e secundária de sífilis. Conforme a doença progride, as espiroquetas tornam-se escassas, e na fase tardia, elas parecem desaparecer. Martín-Ezquerro et al (2009) confirmaram a presença de numerosas espiroquetas em lesões sífilíticas primárias ou secundárias, com uma maior densidade de treponemas encontrados em lesões primárias. Com a evolução da doença, nota-se uma diminuição do número das espiroquetas, que se tornam em menor número em lesões terciárias, encontradas no interior de alguns granulomas. Ainda segundo esse estudo, dos 26 casos de sífilis em pele analisados pelos autores, 5 deles foram negativos para a técnica de imuno-histoquímica e esses dados são explicados pelo fato de 3 pacientes fazerem uso de vários antibióticos por um longo tempo, 1 paciente estar há mais de 3 meses apresentando erupções cutâneas e o outro paciente estava em sífilis secundária por um tempo desconhecido. Esses dados mostram que alguns fatores interferem na

sensibilidade da técnica imuno-histoquímica, levando a falso-negativos em lesões que ainda são positivas ou estão em processo de cura.

Além de aumentar a sensibilidade, essa técnica nos permite localizar precisamente o *T. pallidum* nas lesões, que parece ser localizado em lesões de pele, principalmente, na epiderme e derme superior. Estes dados estão de acordo com estudos recentes sobre a detecção específica dos microorganismos na área dermo-epidérmica (Hoang et al., 2004). No entanto, também tem sido demonstrado que o *T. pallidum* foi encontrado na área da junção dermo-epidérmica (Engelkens et al., 1993). Alguns relatos descrevem que, em lesões de sífilis primária em pele, as espiroquetas possuem uma afinidade mista, tanto por tecido epitelial, quanto por tecido conjuntivo. Já em lesões de sífilis secundária em pele, as espiroquetas possuem uma afinidade epiteliotrópica alojando-se, principalmente, em camada basal e supra-basal do epitélio (Martín-Ezquerria et al., 2009).

Este trabalho contém apenas casos de sífilis secundária, portanto a comparação da marcação imuno-histoquímica entre casos de lesões primárias e secundárias não é possível. Nossos achados mostram um padrão de marcação principalmente epitelial, mas não exclui as marcações em tecido conjuntivo e marcações mistas. Mesmo em lesões ulceradas, houve marcação em áreas de tecido epitelial adjacente. A eficiência da imuno-histoquímica, nesse trabalho, foi de 92,3%, número compatível com o encontrado na literatura e, apesar da marcação ter sido encontrada em 100% dos casos, como não se sabe a sorologia do caso de número 13, não foi considerada nessa porcentagem.

Apesar de suas limitações e da complexidade de interpretação, os testes sorológicos são o sustentáculo do diagnóstico e do acompanhamento da sífilis. Os testes não treponêmicos são positivos de 1 a 4 semanas após o aparecimento do cancro primário e em torno de 6 semanas após a exposição à bactéria. São testes rápidos, simples, baratos e recomendados apenas para monitorar o curso da doença durante e após o tratamento, bem como para detectar casos de reinfecção. As principais limitações desses testes são a sua sensibilidade reduzida na sífilis primária e latente tardia, resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada e o potencial de resultados falso-negativos devido ao efeito prozona, que são reações falso-negativas que ocorrem devido à interferência de altas concentrações de anticorpos alvo em uma amostra. Tais amostras darão uma reação positiva quando diluídas e retestadas (Ratnam, 2005).

O VDRL e o RPR são exemplos de testes não treponêmicos bastante usados, apesar de serem regidos por princípios diferentes. Enquanto o VDRL necessita de uma suspensão de antígeno feita diariamente e de um microscópio para a leitura de seus resultados, o RPR é um teste de floculação que usa uma suspensão estabilizada de antígeno VDRL para que partículas de carvão sejam adicionados para auxiliar na visualização da reação de teste. Enquanto o RPR é um dos testes não treponêmicos mais comumente utilizado, o VDRL é o único usado em líquido cefalorraquidiano devido à sensibilidade e especificidade limitada dos outros testes (Ratnam, 2005). Os títulos em geral são altos nas treponematoses (acima de 1/16), podendo ser superiores a 1/512 (Avelleira; Bottino, 2006).

Por serem testes mais simples, baratos e amplamente utilizados, foram os exames de escolha em todos os casos deste trabalho. Dos 12 casos em que foi realizada sorologia, 6 fizeram uso do VDRL e 3, do RPR, todos com títulos reagentes para sífilis. Apesar das vantagens desses testes, a falsa negatividade em lesões primárias e latentes tardias pode fazer com que haja um atraso no diagnóstico da sífilis. Isso explica o fato de alguns casos aqui descritos, terem sido negativos nas primeiras sorologias realizadas e se tornarem positivos apenas depois da segunda ou terceira tentativas.

Os testes treponêmicos como, por exemplo, o FTA-ABS, podem permanecer reativos por anos com ou sem tratamento, porém os títulos de anticorpos não possuem boa correlação com a atividade da doença. Portanto, esses testes não devem ser utilizados para avaliar a resposta à recaída, terapia ou reinfecção em pacientes previamente tratados. São utilizados, principalmente, como testes confirmatórios para verificar a reatividade em testes não treponêmicos e como diagnóstico em pacientes com sinais e sintomas de sífilis tardia. No entanto, são tecnicamente mais difíceis de executar e mais caros, além de ocorrer casos de falsa positividade (Ratnam, 2005).

Os dados desse estudo chamam a atenção para o fato de que, de 13 casos confirmados, apenas 1 possuía diagnóstico clínico de sífilis, mostrando a falta de uma anamnese bem realizada que evitaria a realização dessas biópsias, bem como a importância em se tentar estabelecer critérios para definição concreta de casos de sífilis em mucosa oral.

7 CONCLUSÕES

1. Não existem características microscópicas específicas para quadros de sífilis, porém, os dados clínicos aliados a um quadro histológico, fornecem informações importantes para que se proceda à solicitação dos testes sorológicos, quando essa solicitação não tiver sido realizada por ausência de hipótese clínica de sífilis.
2. A realização de técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo anti-treponema se mostrou um método eficaz na identificação dos treponemas, principalmente em fases precoces da sífilis. Em casos onde não houve uma solicitação direta de sorologia, devido ausência de hipótese clínica, essa técnica se mostrou bastante sensível, sendo um auxiliar de extrema importância na detecção das espiroquetas.
3. A técnica de coloração pela prata, de Whartin-Starry, apesar de ser um método rápido e de baixo custo, não oferece uma boa sensibilidade quando comparado às outras técnicas. Além disso, sua visualização é muito difícil pela possibilidade de se confundir os microorganismos com outras estruturas do tecido.

REFERÊNCIAS²

- Ackerman AB. Syphilis. Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Disease: An Algorithmic Method Based on Pattern Analysis. *Am J Dermatopathol*. 1985;7(2):105-7.
- Ashton M, Sopwith W, Clarck P, McKelvey D, Lighton L, Mandal D. An outbreak no longer: factors contributing to the return of syphilis in Greater Manchester. *Sex Transm Infect*. 2003;79(4):291-3.
- Avelleira JCR, Bottino G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. *An Bras Dermatol*. 2006;81(2):111-26.
- Azeze B, Fantahun M, Kidan KG, Haile T. Seroprevalence of syphilis amongst pregnant women attending antenatal clinics in a rural hospital in north west Ethiopia. *Genitourin Med*. 1995;71(6):347-50.
- Barrett AW, Villarroel Dorrego M, Hodgson TA, Porter SR, Hopper C, Argiriadou AS, Speight PM. The histopathology of syphilis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(5):286-91.
- Behrhof W, Springer E, Brauninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol*. 2008;61(3):390-95.
- Bi MY, Chen PR, Robinson FW, Gray JM. Alopecia syphilitica-report of a patient with secondary syphilis presenting as moth-eaten alopecia and a review of its common mimickers. *Dermatol Online J*. 2009;15(10):6.
- Bont J, Cairo I, van Doornum GJJ, Coutinho RA, Bleker OP. Positive results from serologic screening for syphilis in pregnancy in the Amsterdam region, 1991–1995. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1999;143(46):2312-5.
- Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes de Controle da Sífilis Congênita. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2005. p. 7-53.
- Bruce AJ, Rogers RS 3 rd. Oral manifestations of sexually transmitted diseases. *Clin Dermatol*. 2004;22(6):520-7.
- Buchacz K, Greenberg A, Onorato I, Janssen R. Syphilis epidemics and human immunodeficiency virus (HIV) incidence among men who have sex with men in the United States: implications for HIV prevention. *Sex Transm Dis*. 2005;32(10 Suppl):S73-9.

² De acordo com Estilo Vancouver

Burstain, JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(1):62-9.

Carbia SG, Lagodin C, Abbruzzese M, Sevinsky L, Casco R, Casos J, Woscoff A. Lichenoid secondary syphilis. Int J Dermatol. 1999;38(1):53-5.

Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The Immunopathobiology of Syphilis: The Manifestations and Course of Syphilis Are Determined by the Level of Delayed-Type Hypersensitivity. Am J Dermatopathol. 2011;33(5):433-60.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases clinical practices guidelines. Centers for Disease Control, Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Diseases Control and Prevention; 1991.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease. Treatment guideline 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51RR-6.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease surveillance 2004. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Diseases Control and Prevention; 2005.

Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. J. Clin. Microbiol. 1997;35(6):1348-52.

Chakraborty R, Luck S. Syphilis is on the increase: the implications for child health. Arch Dis Child. 2008;93(2):105-9.

Chapel TA. The variability of syphilitic chancres. Sex Transm Dis. 1978;5(2):68-70.

Chawla V, Pandit PB, Nkrumah FK. Congenital syphilis in the newborn. Arch Dis Child. 1988;63(11):1393-4.

Chesson HW, Heffelfinger JD, Voigt RF, Collins D. Estimates of primary and secondary syphilis rates in persons with HIV in the United States, 2002. Sex Transm Dis. 2005;32(5):265-9.

Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Teixeira GG, Leal Ados S, Silva Tde J, Oliveira MP. Screening of sexually transmitted diseases in clinical and non-clinical settings in Salvador, Bahia, Brazil. Cad Saude Publica. 2006;22(2):325-34.

Compilato D, Amato S, Campisi G. Resurgence of syphilis: a diagnosis based on unusual oral mucosa lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(3):45-9.

Creegan L, Bauer HM, Samuel MC, Klausner J, Liska S, Bolan G. An evaluation of the relative sensitivities of the Venereal Disease Research Laboratory test and the *Treponema pallidum* particle agglutination test among patients diagnosed with primary syphilis. Sex Transm Dis. 2007;34(12):1016-8.

Dahle UR, Sunde TP, Tronstad L. Treponemes and endodontic infections. 2003;6:160-70.

Dilley JW, Klausner JD, McFarland W, Kellogg TA, Kohn R, Wong W. Trends in primary and secondary syphilis and HIV infections in men who have sex with men – San Francisco and Los Angeles, California. 1998-2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004;53(26):575-8.

Ditzen AK, Braker K, Zoellner KH, Teichmann D. The syphilis-HIV interdependency. Int J STD AIDS. 2005;16(9):642-3.

Domantay-Apostol GP, Handog EB, Gabriel MTG. Syphilis: the international challenge of the great imitator. Dermatol Clin. 2008;26(2):191-202.

Eaton M. Syphilis and HIV: old and new foes aligned against us. Curr Infect Dis Rep. 2009;11(2):157-62.

Egglestone SI, Turner AJ. Serological diagnosis of syphilis. PHLS Syphilis Serology Working Group. Commun Dis Public Health. 2000;3(3):158-62.

Engelkens HJ, ten Kate FJ, Judanarso J, Vuzevski VD, van Lier JB, Godschalk JC, van der Sluis JJ, Stolz E. The localisation of treponemes and characterisation of the inflammatory infiltrate in skin biopsies from patients with primary or secondary syphilis, or early infectious yaws. Genitourin Med. 1993;69(2):102-7.

Farhi DC, Wells SJ, Siegel RJ. Syphilitic lymphadenopathy. Histology and human immunodeficiency virus status. Am J Clin Pathol. 1999;112(3):330-4.

Ficarra G, Carlos R. Syphilis: the renaissance of an old disease with oral implications. Head Neck Pathol. 2009;3(3):195-206.

Fonseca E, Garcia-Silva J, del Pozo J, Yebra MT, Cuevas J, Contreras F. Syphilis in an HIV infected patient misdiagnosed as leprosy. J Cutan Pathol. 1999;26(1):51-4.

French P. Syphilis. BMJ 2007;334(7585):143-7.

Gaspari V, D'Antuono A, Misciali C. Secondary syphilis with intestinal involvement: description of a case. G Ital Dermatol Venereol. 2008;143(1):79-82.

Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, Schrenzel J, Hirschel B. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. Sex Transm Infect. 2009;85 (4):264-9.

Ghanem KG, Moore RD, Rompalo AM, Erbelding EJ, Zenilman JM, Gebo KA. Lumbar puncture in HIV-infected patients with syphilis and no neurologic symptoms. Clin Infect Dis. 2009;48(6):816-21.

Grispan D. Enfermedades de la boca. Tomo II. Buenos Aires: Ed. Mundi; 1973. p. 1280-2.

Guia de controle das DST. Brasília: MS/PN de DST/Aids; 1999.

Hay PE, Clarke JR, Strugnell RA, Taylor-Robinson D, and Goldmeier D. Use of the polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990;56(3):233-8.

Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(5):495-501.

Hervier B, Wastiaux H, Freour T, Masseur A, Corvec S, Armingeat T, Hamidou M. Sarcoidosis-like granulomatosis revealing a tertiary syphilis. *Rev Med Interne.* 2009;30(9):806-8.

Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):497-502.

Ho EL, Lukehart AS. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4584-92.

Hoang MP, High WA, Molberg KH. Secondary syphilis: a histologic and immunohistochemical evaluation. *J Cutan Pathol.* 2004;31(9):595-9.

Hollier LM, Harstad TW, Sánchez PJ, Twickler DM, Wendel GD Jr. Fetal syphilis: clinical and laboratory characteristics. *Obstet Gynecol.* 2001;97(6):947-53.

Hook EW III, Marra CM. Acquired syphilis in adults. *New Engl J Med.* 1992;326(16):1060-8.

Hook EW 3rd, Peeling RW. Syphilis control—a continuing challenge. *N Engl J Med.* 2004;351(2):122-4.

Hopkins S, Lyons F, Coleman C, Courtney G, Bergin C, Mulcahy F. Resurgence in infectious syphilis in Ireland: an epidemiological study. *Sex Transm Dis.* 2004;31(5):317-21.

Hunt JL. Molecular pathology in anatomic pathology practice. A review of basic principles. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(2):248-60.

Jeerapaet P, Ackerman AB. Histologic patterns of secondary syphilis. *Arch Dermatol.* 1973;107:373-7.

Kent ME, Romanelli F. Reexamining syphilis: an update on epidemiology, clinical manifestations, and management. *Ann Pharmacother.* 2008;42(2):226-36.

Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, Multhaup S, Prinz JC. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(2):143-5.

Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):29-49.

Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(1):1-21.

Lautenschlager S. Diagnosis of syphilis: clinical and laboratory problems. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006;4(12):1058-75.

Lawrence P, Saxe N. Bullous secondary syphilis. *Clin Exp Dermatol.* 1992;17(1):44-6.

Leão JC, Gueiros LA, Porter SR. Oral manifestations of syphilis. *Clinics.* 2006; 61(2):161-6.

Lee JY, Lin MH, Jung YC. Extragenital syphilitic chancre manifesting as a solitary nodule of the nipple. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006;20(7):886-7.

Lee KH, Choi HJ, Lee MG, Lee JB. Virulent *Treponema pallidum* 47 kDa antigen regulates the expression of cell adhesion molecules and binding of T-lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J.* 2000;41(5):623-33.

Lee V, Kinghorn G. Syphilis: an update. *Clin Med.* 2008;8:330-333.

Lee WS, Lee MG, Chung KY, Lee JB. Detection of *Treponema pallidum* in tissue: a comparative study of the avidin-biotinperoxidase complex, indirect immunoperoxidase. *Yonsei Med J.* 1991;32(4):335-41.

Leroy V, De Clercq A, Ladner J, Bogaerts J, Van de Perre P, Dabis F. Should screening of genital infection be part of antenatal care in areas of high HIV prevalence? A prospective cohort study from Kigali, Rwanda, 1992- 1993. *Genitourin Med.* 1995;71(4):207-11.

Levaditi C. Sur la coloration du *Spirochaete pallida* Schaudinn dans les coupes. *C R Seanc So Biol.* 1905; 59:326-38.

Lewis LL. Congenital syphilis. Serologic diagnosis in the young infant. *Infect Dis Clin North Am.* 1992;6(1):31-9.

Linscott A. Molecular Diagnostics for Infectious Disease *Pathol Case Rev.* 2002;7(2):64-9.

Liotta EA, Turiansky GW, Berberian BJ, Sulica VI, Tomaszewski MM. Unusual presentation of secondary syphilis in 2 HIV-1 positive patients. *Cutis.* 2000;66(5): 383-6, 389.

Little JW. Syphilis: an update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(1):3-9.

Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. J. Clin. Microbiol. 2001;39(5):1941-6.

Lynn WA, Lightman S. Syphilis and HIV: a dangerous combination. Lancet Infect Dis. 2004;4(7):456-66.

Magnarelli L, Anderson JF, Johnson RC. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 1987;156(1):183-8.

Magro CM, Crowson AN. Lichenoid and granulomatous dermatitis. Int J Dermatol. 2000;39(2):126-33.

Marcus U, Kollan C, Bremer V, Hamouda O. Relation between the HIV and the re-emerging syphilis epidemic among MSM in Germany: an analysis based on anonymous surveillance data. Sex Transm Dis. 2005;81(6):456-7.

Marfin AA, Liu H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitz LE. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2001;40(4):163-6.

Martín-Ezquerro G, Fernandez-Casado A, Barco D, Jucglà A, Juanpere-Rodero N, Manresa JM, de Almeida LMS, Rodríguez-Peralto JL, Kutzner H, Cerroni L, Barranco C, Lloreta J, Requena L, Ramon M, Pujol RM. *Treponema pallidum* distribution patterns in mucocutaneous lesions of primary and secondary syphilis: an immunohistochemical and ultrastructural study. Human Pathology. 2009;40(5):624-30.

Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, Tilley P, Read R, Anderson B, Roy C, Singh AE. Molecular Characterization of Syphilis in Patients in Canada: Azithromycin Resistance and Detection of *Treponema pallidum* DNA in Whole-Blood Samples versus Ulcerative Swabs. J C Microbiol. 2009;1668-73.

McCalmont T, Macerenco R. Syphilis: it's around and ready for (mis)diagnosis. J Cutan Pathol. 2008;35:95.

McComb ME, Telang GH, Vonderheid EC. Secondary syphilis presenting as pseudolymphoma of the skin. J Am Acad Dermatol. 2003;49(2 suppl):S174-S176.

Mgnone CS, Passey ME, Anang J, Peter W, Lupiwa T, Russell DM, Babona D, Alpers MP. Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted diseases in two major cities in Papua New Guinea. Sex Transm Dis. 2002;29(5):265-70.

Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Mignogna C, Delfino M. Secondary syphilis mimicking pemphigus vulgaris. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23(4):479-80.

Mitchell SJ, Engelman J, Kent CK, Lukehart SA, Godornes C, Klausner JD. Azithromycin-resistant syphilis infection: San Francisco, California, 2000-2004. Clin Infect Dis. 2006;42:337-45.

Morton RS, Rashid S. "The syphilis enigma": the riddle resolved? Sex Transm Infect. 2001;77(5):322-4.

Mullooly C, Higgins SP. Secondary syphilis: the classical triad of skin rash, mucosal ulceration and lymphadenopathy. Int J STD AIDS. 2010;21(8):537-45.

Nascimento AC, Espreafico M, Larson ML, Monesi N, Rossi NM, Rodrigues V. Tecnologia do DNA recombinante. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2003.

Noel CB, Moeketsi K, Kies B. Cavernous sinus syndrome, an atypical presentation of tertiary syphilis: Case report and review of the literature. Clin Neurol Neurosurg. 2011;113(1):65-7.

Noordhoek GT, Wolters EC, Jonge MEJ, and Embden JDA. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. J Clin Microbiol. 1991; 29(9):1976-84.

Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. J Clin Microbiol. 1996;34(1):49-54.

Osler W, Churchman J. Syphilis. In: Osler W, McCrae T, eds. Modern Medicine. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1914;144-215.

Palacios R, Jiménez-Oñate F, Aguilar M, Galindo MJ, Rivas P, Ocampo A, Berenguer J, Arranz JA, Ríos MJ, Knobel H, Moreno F, Ena J, Santos J. Impact of syphilis infection on HIV viral load and CD4 cell counts in HIV-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr. 2007;44(3):356-9.

Papini M, Bettacchi A, Guiducci A. Nodular secondary syphilis. Br J Dermatol. 1998; 138(4):704-5.

Park Y, Park Y, Joo SY, Park MH, Kim HS. Evaluation of a Fully Automated *Treponema* Test and Comparison With Conventional VDRL and FTA-ABS Tests. Am J Clin Pathol 2011;136(5):705-10.

Penna GO, Domingues CM, Siqueira JB Jr, Elkhoury AN, Cechinel MP, Grossi MA, Gomes Mde L, Sena JM, Pereira GF, Lima Júnior FE, Segatto TC, Melo FC, Rosa FM, Silva MM, Nicolau RA. Dermatological diseases of compulsory notification in Brazil. An Bras Dermatol. 2011;86(5):865-77.

Pereira TM, Fernandes JC, Vieira AP, Basto AS. Tertiary syphilis. Int J Dermatol. 2007;46 (11):1192-5.

Phelps RG, Knispel J, Tu ES, et al. Immunoperoxidase technique for detecting spirochetes in tissue sections: comparison with other methods. Int J Dermatol. 2000; 39(8):609-13.

Quatresooz P, Piérard GE. Skin Homing of *Treponema pallidum* in Early Syphilis. An Immunohistochemical Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17(1):47-50.

Quérel C. The history of syphilis. *Le Mal de Naples*, translator. Baltimore: Johns Hopkins Paperbacks; 1992.

Ramoni S, Cusini M, Francesca Gaiani F, Crosti C. Syphilitic chancres of the mouth: three cases. *Acta Derm Venereol.* 2009;89(6):648-9.

Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005; 16(1):45-51.

Rawstron SA, Jenkins S, Blanchard S, Li PW, Bromberg K. Maternal and congenital syphilis in Brooklyn, NY. Epidemiology, transmission, and diagnosis. *Am J Dis Child* 1993;147(7):727-31

Reuter K. *Spirochaete pallida* in der Aortenwand bei hellerscher Aortitiism. *Munch Med Wochenschr.* 1906;53:778.

Rotschild BM. History of syphilis. *Clin Infect Dis.* 2005;40(10):1454-63.

Salata RA. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In Andreoli TE. *Medicina interna básica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002;754-61.

Sanchez MR. Syphilis. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: Mc Graw Hill; 2008. p. 1955-77.

Schaudinn F, Hoffmann E. Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Spirochaeten in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. *Arbeiten aus dem K Gesundheitsamte.* 1905;22:527-34.

Scott CM, Flint SR. Oral syphilis – re-emergence of an old disease with oral manifestations. *Int. J. Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(1):58-63.

Sell S. *Immunology, Immunopathology and Immunity*. Washinton, DC: ASM Press; 2001.

Serapião CJ, Silva PFO. Método de Warthin Starry para treponemas em corte, segundo Serapião & Silva. Métodos selecionados de colorações e de impregnação argênticas. In: Michalany J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. São Paulo: Pedagógica Universitária; 1980. p. 123-79.

Shaffer JM, Baker-Zander SA, Lukehart SA. Opsonization of *Treponema pallidum* is mediated by immunoglobulin G antibodies induced only by pathogenic treponemes. *Infect Immun.* 1993;61(2):781-4.

Shatley MJ, Walker BL, McMurray RW. Lues and lupus: syphilis mimicking systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus*. 2001;10(4):299-303.

Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic and some biologic features. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):187-209.

Souza AT. Curso de história da medicina. Das origens aos fins do século XVI. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1996. p. 267-74.

Stokes JH. Modern clinical syphology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1934.

Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, Morse S, Markowitz LE, and St. Louis ME. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona county with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis*. 2001;183(11):1601-6.

Szwarcwald CL, de Carvalho MF, Barbosa Junior A, Barreira D, Speranza FA, de Castilho EA. Temporal trends of HIV-related risk behavior among Brazilian military conscripts. *Clinics*. 2005 60(5):367-74.

Talanin NY, Shelley ED, Kapkaev RA, Kang MK, Skvortzava OA. Koebner reaction in psoriasis due to secondary syphilis. *Cutis*. 1994;54(5):332-4.

Temmerman M, Gichangi P, Fonck K, Apers L, Claeys P, Van Renterghem L, Kiragu D, Karanja G, Ndinya-Achola J, Bwayo J. Effect of a syphilis control programme on pregnancy outcome in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Infect*. 2000;76(2):207-11.

Thyresson N. Girolamo Fracastoro and syphilis. *Int J Dermatol* 1995;10(34):735-9.

Tobian AA, Quinn TC. Herpes simplex virus type 2 and syphilis infections with HIV: an evolving synergy in transmission and prevention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009;4(4):294-9.

Tramont EC. *Treponema pallidum* (syphilis). In: Mandell GL, Benett JF, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Orlando, FL: Churchill Livingstone, 2005. p. 2768-84.

Walker GJA, Walker DG. Congenital syphilis: A continuing but neglected problem. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12(3):198-206.

Wasserman AV, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaction bei Syphilis. *Dtsch Med Wochenschr*. 1906;32:745-6.

Weintrob AC, Gu W, Qin J, Robertson J, Ganeson A, Crum-Cianflone NF, Landrum ML, Wortmann GW, Follman D, Agan BK. Syphilis co-infection does not affect HIV disease progression. *Int J STD AIDS*. 2010;21(1):57-9.

Wenhai L, Jianzhong Z, Cao Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate. *Dermatology*. 2004;208(2):94-7.

Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, Wicher V. Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1992;30(2):497-500.

Wong ML, Chan RKW, Chua WL, Wee S. Sexually transmitted diseases and condoms use among female freelance and brothel-based sex workers in Singapore. Sex Transm Dis. 1999;26(10):593-600.

Woods CR. Syphilis in children: Congenital and Acquired. Semin Pediatric Infec Dis. 2005;16(4):245-57.

Wu CC, Tsai CN, Wong WR, Hong HS, Chuang YH. Early congenital syphilis and erythema multiforme-like bullous targetoid lesions in a 1-day-old newborn: detection of *Treponema pallidum* genomic DNA from the targetoid plaque using nested polymerase chain reaction. J Am Acad Dermatol. 2006;55(Suppl 2):S11–S15.

Zinkernagel RM. Antiinfection immunity and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci. 2002;958:3-6.

ANEXO A – Parecer de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 35/11
CAAE 0035.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Diagnóstico de sífilis através de lesões bucais utilizando a técnica de imunoistoquímica**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Carla Silva Siqueira sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Fernando Ricardo Xavier da Silveira e Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 19 de abril de 2011.

Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP