Maria Dulce Caoro Horie Wojitani

**Avaliação da frequência do polimorfismo nos genes que codificam a
lecitina ligadora da manose (MBL) e o antagonista do receptor da
interleucina-1 (IL1-Ra) em mulheres portadoras de candidíase
vulvovaginal recorrente**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientadora: Dra. Iara Moreno Linhares

São Paulo

2011

Maria Dulce Caoro Horie Wojitani

**Avaliação da frequência do polimorfismo nos genes que codificam a
lecitina ligadora da manose (MBL) e o antagonista do receptor da
interleucina-1 (IL1-Ra) em mulheres portadoras de candidíase
vulvovaginal recorrente**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Dra. Iara Moreno Linhares

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Wojitani, Maria Dulce Caoro Horie

Avaliação da frequência do polimorfismo nos genes que codificam a lectina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1-Ra) em mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente / Maria Dulce Caoro Horie Wojitani. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Iara Monteiro Linhares.

Descritores: 1.Candidíase vulvovaginal recorrente 2.Polimorfismo genético
3.Lectina de ligação a manose 4.Proteína antagonista do receptor de interleucina 1

USP/FM/DBD-068/11

DEDICATÓRIA

*Á minha filha Mariana, pelo carinho, compreensão,
companheirismo e constante incentivo.*

Razão do meu viver, a luz da minha vida...

*À minha mãe Tomico, pelo dom da vida, por seu amor
incondicional e doação plena.*

Saudades...

*Aos meus pais do coração, Danilo e Alzira, por me amarem e
acreditarem no meu sonho e por estarem sempre presentes em
todos os momentos da minha vida.*

Minha eterna gratidão e amor...

À Deus

Caminho, Verdade e Vida.

Pai Eterno, fonte de força e esperança.

Essência da minha vida e formação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Paulo e Danilo pelo amor, carinho, amizade e por serem sempre presentes em minha vida e na de Mariana.

Ao meu cunhado-irmão Silvio Antônio pelo constante suporte em todas as fases desta tese, pelos preciosos ensinamentos, companheirismo e transmissão do seu amor à vida acadêmica.

À minha irmã Inês por seu amor incondicional, seu incentivo, por sempre acreditar em meus sonhos e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sobrinhos Silvio Augusto e Lucas, minhas paixões e orgulho.

*Aos meus tios Dario, Sebastião e Maria Gabriela pelos seus
conselhos e apoio.*

Às minhas primas Gabriela e Isabel, pelo companheirismo e carinho.

*Minha gratidão por partilharem dos momentos importantes da
minha vida.*

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat pela oportunidade a mim concedida de desenvolver este trabalho e estímulo à todos os pós-graduandos.

À Dra. Iara Moreno Linhares pela dedicada orientação, amizade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Steven Witkin pela inestimável colaboração, atenção e paciência sempre dispensadas.

À Dra. Lana Maria de Aguiar pelo estímulo constante ao meu crescimento interior e profissional, carinho, apoio e amizade.

Aos Dr. Oswaldo Okusu, Dr. Miguel Bartolomé Veras e Dra. Arlete Gianfaldoni, pela amizade e incentivo.

À amiga Dra. Maria Eugênia Caetano pela amizade sincera, apoio no primeiro passo para meu aprimoramento profissional.

Ao Dr. Paulo Sérgio Pereira da Conceição pelo companheirismo, conselhos e amizade.

Às amigas, quase irmãs Ludmila Miliauskas Fernandes, Mônica de Almeida Gonçalves, Cássia Regina Dumitrescu Dias, Gisele Assumpção e Ana Paula Selli Cocci, por sempre me incentivarem e me acolherem nos momentos difíceis e comemorarem comigo as minhas conquistas.

Às Dras. Maria Aparecida Basile e Elia Miranda pelo constante incentivo e carinho.

À Dra. Anne Marie Bongiovani pelo apoio e colaboração.

Às funcionárias:

Srta. Cláudia Vieira

Srta. Mara Núbia Caetano de Almeida

Sra. Edilene Bento da Silva

Sra. Valéria Vilhena

Sra. Marinalva Souza Aragão

Sra. Márcia Arruda

Ao Sr. Rogério Ruscito

Sra. Cristiane Strega

Às pacientes que permitiram que todas as informações e exames se transformassem nesta tese

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Candidíase vulvovaginal.....	01
1.2- Imunologia na candidíase vulvovaginal	05
1.3- Polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina 1(IL1-Ra)	11
2. PROPOSIÇÃO.....	16
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	17
3.1- Desenho do estudo	17
3.2- Tamanho amostral.....	17
3.3- Casuística.....	17
3.4- Método.....	19
3.4.1- Método de estudo	19
3.4.2- Descrição da leitura.....	20
3.4.3- Definição das variáveis	21
3.5- Método estatístico	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	50
7. ANEXOS.....	51
8. REFERÊNCIAS	61

Lista de abreviaturas

aC	antes da era cristã
ACI	anticoncepcional injetável
ACO	anticoncepcional oral
<i>Candida sp.</i>	candida espécies
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CVVR	candidíase vulvovaginal recorrente
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DST	doenças sexualmente transmissíveis
et al	e colaboradores
°C	graus centígrados
HPV	<i>Human papilloma virus</i>
ICM	imunidade celular mediada
IL-1	interleucina 1
IL-1Ra	antagonista do receptor da interleucina-1
IL-2	interleucina 2
LTB	laqueadura tubária bilateral
MAC	método contraceptivo
MBL	<i>mannose binding lectin</i>
mg	miligramas
ml	mililitros

mol/l	mol por litro
N	amostra
p	p valor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
pH	potencial de hidrogênio
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	rotações por minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH1	<i>T helper 1</i>
TH2	<i>T helper 2</i>

Lista de tabelas

Tabela 1.	Características gerais e antecedentes de DST de mulheres com e sem CVVR	24
Tabela 2.	Escolaridade referida pelas mulheres com e sem CVVR	25
Tabela 3.	Antecedentes obstétricos das mulheres com e sem CVVR	26
Tabela 4.	Distribuição dos diferentes métodos anticoncepcionais adotados pelas mulheres com e sem CVVR	27
Tabela 5.	Sintomas referidos pelas pacientes com CVVR	28
Tabela 6.	Achados do exame ginecológico em pacientes com CVVR	29
Tabela 7.	Tipo de flora vaginal segundo a bacterioscopia pelo método de Gram nas pacientes com e sem CVVR	30
Tabela 8.	Resultado da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou.....	31
Tabela 9.	Número de parceiros sexuais nos últimos seis meses referidos pelas pacientes com e sem CVVR	32
Tabela 10.	Polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL em mulheres com e sem CVVR	33

Tabela 11.	Polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra em mulheres com e sem CVVR	34
Tabela 12.	Polimorfismo dos genes que codificam a MBL e o IL-Ra em mulheres com e sem CVVR	35
Tabela 13.	Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR	36
Tabela 14.	Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR	38

RESUMO

Wojitani MDCH. *Avaliação da frequência do polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1-Ra) em mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 72p.

A candidíase vulvovaginal corresponde a uma das mais frequentes infecções do trato reprodutivo. Estima-se que 75% das mulheres na idade reprodutiva experimentarão pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante suas vidas, a maioria evoluirá com episódios infrequentes, entretanto, 5% sofrerão recorrência, ou seja, quatro ou mais episódios de candidíase vulvovaginal comprovadas clínica e laboratorialmente no período de 1 ano. Os mecanismos pelos quais as recorrências ocorrem ainda são pouco conhecidos, estando provavelmente relacionados à alterações na imunidade local. O presente estudo teve como objetivo avaliar as associações entre os polimorfismos nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e do antagonista do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra) com a candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) em mulheres brasileiras. Foram estudadas 100 mulheres portadoras de CVVR atendidas no Serviço de Imunologia Genética e Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para a análise dos polimorfismos nos genes que codificam para a MBL e o IL1-Ra realizou-se coleta de células bucais que foram enviadas para *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University*. Resultados: Mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente apresentaram maior frequência de polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL quando comparadas a mulheres saudáveis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência do polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra entre os grupos estudados.

Descritores: candidíase vulvovaginal recorrente, polimorfismo genético, lecitina de ligação de manose, proteína antagonista do receptor de Interleucina-1.

SUMMARY

Wojitani MDCH. *Frequency of polymorphisms in the genes coding for mannose binding ligation (MBL) and Interleukin-1 receptor antagonist (IL1-Ra) in women with recurrent vulvovaginal candidiasis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 72p.

Vulvovaginal candidiasis is the most common genital infection in women during their childbearing years. About 75% of women suffer at least one symptomatic episode during their lives. Most of them will have infrequent episodes, but 5% will suffer recurrent episode of vulvovaginal candidiasis. The mechanisms responsible for recurrent vulvovaginal candidiasis (RVCC) remain a matter of speculation, although an alteration in local immunity appears to be a major factor. The aim of this study was to assess the correlation between polymorphisms in the genes coding for mannose-binding lectin (MBL) and interleukin-1 receptor antagonist (IL1-Ra) and RVCC in women from São Paulo, Brazil. The study population consisted of 100 women with RVCC, who were seen at Serviço de Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. To analyse for the MBL codon 54 gene polymorphism and for IL1-Ra, buccal cells were obtained with a cotton swabs and shipped to New York at ambient temperature. The polymorphisms were identified in the *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University*. Results: Women with RVCC present a high frequency of polymorphisms at codon 54 in the gene coding for MBL; on the other hand there were no differences in polymorphism frequency in the gene coding for IL1-Ra when compared to control women.

Descriptors: candidiasis vulvovaginal recurrent, polymorphism genetic, mannose binding lectin, interleukin 1 receptor antagonist protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal corresponde a uma das mais frequentes infecções do trato reprodutivo. A *Candida albicans*, organismo comensal dimórfico dos tratos genital e gastro-intestinal é o agente etiológico em cerca de 85 a 90% das pacientes com cultura vaginal positiva para fungos. O restante dos casos é devido a espécies não *albicans*, sendo a maioria representada pela *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (Fidel & Sobel, 1996; Weissenbacher et al, 2009; Correa et al, 2009).

A *Candida sp.* é classificada como fungo Gram-positivo, dimórfico, saprófita, que tem limitada virulência (Sobel, 1998). Pode apresentar-se sob a forma de esporos e hifas que, ao se agruparem, formam os micélios, responsáveis pela manifestação clínica da candidíase (Horovitz, 1991).

Os fungos ocorrem na natureza como saprófitas de seres humanos e animais. Quando existe um desequilíbrio no ecossistema em que se encontra, o fungo pode se tornar maléfico, invasivo e causar doenças (Witkin et al, 2000).

Os fungos possuem um corpo vegetativo chamado de talo ou soma que é composto de finos filamentos unicelulares chamados de hifas. Estas hifas geralmente formam um aglomerado chamado de micélio por onde o alimento é absorvido; encontrado geralmente onde há parasitismo podendo causar danos ao epitélio humano (Cutler, 1991).

A *Candida sp* como agente causal de vulvovaginite foi descrita pela primeira vez em 1849 por Wilkinson. Em 1986, Kurtz et al desenvolveram um sistema de identificação do DNA que permitiu o estudo genético de diferentes tipos de *Candida*. A *Candida sp* é um fungo que se reproduz por brotamento e assume a forma tubular ou de hifa. Na classificação filogenética, pertence à classe dos *Ascomycetes*, subclasse *Hemiascomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Cryptococcaceae*. É considerada saprófita, porém oportunista, aproveitando-se do estado imunológico débil do hospedeiro para atuar como agente agressor, levando ao quadro eventual de candidíase (Sobel et al, 1992).

Estima-se que aproximadamente 75% de todas as mulheres na idade reprodutiva experimentarão pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante suas vidas (Milanesse et al, 2008; Fan et al, 2008; Weissenbacher et al, 2009; Correa et al, 2009). A maioria destas mulheres evoluirá com episódios infrequentes, muitos dos quais precipitados por fatores como gravidez, uso de antimicrobianos, uso de contraceptivos hormonais, estado de imunossupressão, *diabetes mellitus*, hábitos inadequados de higiene e vestuário, deficiência de ferro e de zinco (Fidel & Sobel, 1996; Duarte & Landers, 1998; Linhares et al, 2005; Weissenbacher et al, 2009). Entretanto, 5% das mulheres com candidíase vulvovaginal sofrerão de episódios recorrentes, apesar de responderem à terapêutica antifúngica adequada durante a fase aguda da doença e de evitarem, ou mesmo não apresentarem, os fatores predisponentes para o desenvolvimento de um novo surto de candidíase (Hurley, 1981; Sobel,

1988; Fidel & Sobel, 1996; Fidel et al, 1997; Witkin et al, 2000; Mardh et al, 2002).

Os gastos com diagnósticos e tratamentos da candidíase vulvovaginal nos Estados Unidos da América ultrapassam 1 bilhão de dólares por ano, onde esta moléstia é a segunda infecção vaginal mais comum depois da vaginose bacteriana. O número de prescrições de fármacos para tratamento fúngico dobrou entre 1980 e 1990, chegando a 13 milhões de prescrições (Sobel et al, 2007).

A candidíase é rara antes da menarca e apresenta um pico de recorrência nas terceira e quarta décadas da vida, sendo mais comum na fase lútea do ciclo menstrual. Após a menarca, com o aumento dos níveis hormonais e por possíveis deficiências nos mecanismos de defesa vaginal, a candidíase pode tornar-se mais frequente.

Define-se candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) como o aparecimento de quatro ou mais episódios em um ano, com evidências clínicas e laboratoriais de infecção por *Candida sp.* (Mardh et al, 2002).

Entretanto, os fatores que influenciam a susceptibilidade às recorrências ainda permanecem indefinidos, embora os estudos já tenham avançado em direção à alterações na genética como fator predisponente. Assim, há interesse e motivação para novos estudos e pesquisas (Sobel, 1995; Giraldo et al, 2000; Witkin et al, 2000; Mardh et al, 2002; Fidel, 2007).

Algumas mulheres podem ser diagnosticadas precipitadamente como candidíase recorrente. Reações de hipersensibilidade ou reações alérgicas às terapêuticas antimicóticas podem também resultar na manutenção dos

sintomas e atribuídos à presença de fungos. Esses processos podem resultar em elevação dos níveis de prostaglandina E2, com consequente inibição da imunidade mediada por células (Witkin et al, 1989; Neves et al, 2005). Em um estudo, *Candida sp.* foi identificada por cultura vaginal apenas em 28% de 554 mulheres com sintomas da candidíase vulvovaginal (Witkin et al, 2000).

É importante, portanto, para se obter uma resposta terapêutica satisfatória, fazer um diagnóstico correto. Deve-se diferenciar o termo “crônico” e “recorrente”, os quais muitas vezes são interpretados erroneamente. Uma infecção crônica é ativa, persistente por um longo período. Já a recorrência é aquela onde o processo infeccioso termina, permanecendo ausente por um período curto, mas que retorna sintomático. Assim é a candidíase recorrente (Witkin et al, 1991).

A candidíase vulvovaginal recorrente tem importância, não só pela repercussão no aspecto financeiro, mas nas mudanças diárias marcantes da mulher, na alteração de humor (pelo incômodo do quadro com queimação, dor, ardor, edema local, disúria de variada intensidade) (Mardh et al, 2005), distúrbios sexuais (dispareunia, diminuição da libido, desconforto) (Stewart et al, 1990) e no âmbito afetivo (auto-estima) (Correa et al, 2009).

Ressalta-se também a diferença entre infecção e colonização. Muitas mulheres assintomáticas são continuamente colonizadas por *Candida albicans* em suas vaginas, mas isso é diferente de uma infecção latente ou crônica. O que transforma uma colonização comensal em infecção é ignorado. Essas pacientes apresentam anticorpos contra a *Candida*, porém,

infelizmente esses anticorpos não previnem o desenvolvimento da infecção vaginal sintomática (Sobel, 1993; Witkin et al, 2000).

1.2. Imunologia na candidíase vulvovaginal

O termo imunidade é derivado da palavra em latim *immunitas* que se referia aos deveres dos senadores romanos (Abbas et al, 2000). Cita-se que Thucydides, em Atenas, durante o século quinto aC foi o pioneiro a relacionar a imunidade às “pestes”. O conceito, portanto, de imunidade tem suas raízes na antiguidade e mantém seus segredos na ciência até hoje, chamando a atenção de muitos pesquisadores.

A resposta imune é a forma mais efetiva para evitar que a infecção se estabeleça, sendo representada pela defesa do organismo frente a qualquer fator agressor para proteção do mesmo. Constitui-se na soma de todos os mecanismos de defesa que protegem o indivíduo contra as doenças infecciosas (Tosi, 2005).

Há dois tipos de imunidade: natural ou inata e a adquirida ou adaptativa.

A imunidade inata é considerada não específica, significando que seus fatores constituintes estão sempre presentes no organismo, alertas para defesa o tempo todo em níveis basais (Pier, 2004). São eles:

- barreiras anatômicas representadas pela pele, membranas mucosas e muco;
- mecanismos de eliminação, como a fagocitose;

- variáveis fisiológicas como o pH, temperatura, proteínas ligadoras de ferro;

- proteínas enzimáticas como o sistema complemento e lisozimas;

- defesas químicas como o óxido nítrico e íon superóxido;

- peptídeos antimicrobianos representados pelas defensinas, lecitina ligadora de manose (MBL) e outros.

A resposta imune inata é rápida, representa o combate inicial à infecção (Pellis et al, 2005) e alerta a imunidade adquirida para iniciar uma resposta específica dirigida ao agente agressor, através da formação de anticorpos ou da resposta celular (Witkin, 2004).

A imunidade adquirida, como o próprio nome diz, é adaptada ao encontrar determinado patógeno específico. De maneira diferente da imunidade natural, necessita de várias horas para se desenvolver. Assim, somente quando as defesas inatas forem ultrapassadas ou sobrepujadas, o hospedeiro passa a necessitar de uma resposta imune induzida ou adaptativa, envolvendo a ativação de uma variedade de mecanismos humorais ou celulares:

- imunidade humoral: produção de anticorpos e citocinas;

- imunidade celular, mediada por células, com ativação de linfócitos T (Janeway & Travers, 1997; Roitt & Rabson, 2003).

O sistema imune tem três principais características:

A primeira é a especificidade, ou seja, a habilidade de reconhecer e distinguir cada molécula com suas características individuais.

A segunda é a de discriminar entre elementos próprios e elementos estranhos ao organismo, ou seja, há uma coexistência pacífica com inúmeras proteínas do próprio hospedeiro e com as outras estranhas a ele.

A terceira função é a capacidade de memória, sendo capaz de reconhecer uma substância anteriormente estranha e prevenir infecções pelo mesmo agente.

Assim, cada etapa da resposta imune é uma sequência de complexos eventos, envolvendo várias células, cada qual com sua função (Janeway & Travers, 1997; Roitt & Rabson, 2003).

Os leucócitos derivam de precursores na medula óssea. Dão origem aos leucócitos polimorfonucleares e aos macrófagos do sistema imune inato e aos linfócitos do sistema imune adaptativo ou adquirido.

Existem dois tipos principais de linfócitos: os linfócitos B que amadurecem na medula óssea, e os linfócitos T que amadurecem no timo. A medula óssea e o timo são, pois, conhecidos como órgãos linfóides centrais. Uma vez amadurecidos, os macrófagos e os mastócitos migram para os tecidos do corpo, mas todas as outras células do sistema imunológico circulam no sangue.

Os linfócitos recirculam, continuamente do sangue para os órgãos linfóides periféricos, onde o antígeno é capturado, retornando ao sangue através dos vasos linfáticos. Os três principais tipos de tecido linfóide periférico são o baço, que coleta antígenos do sangue, os linfonodos que apanham o antígeno dos sítios de infecção nos tecidos, e o tecido linfóide associado ao intestino, que recolhe antígenos do intestino. As respostas

imunes adquirida são iniciadas nos tecidos linfóides periféricos (Roitt & Rabson, 2003).

Os patógenos que ultrapassam essa barreira se confrontam com duas linhas de defesa imediatas. Primeiro, elas se expõem ao ataque humoral pela via de ativação alternativa do sistema complemento, que está espontaneamente ativo no plasma e pode opsonizar ou destruir patógenos, poupando as células hospedeiras, que estão protegidas pelas proteínas reguladoras do complemento. Em segundo lugar, elas podem ser englobadas pelos macrófagos, dotados de receptores para os componentes agressores: bactérias, vírus e fungos (Lyczack, 2004).

Os principais responsáveis pela ativação da resposta da imunidade celular mediada (ICM) são os linfócitos T e a resposta humoral será determinada pelos linfócitos B. Há duas vias de ativação dos linfócitos T:

A resposta humoral é determinada pela ativação de linfócitos B e caracterizada pela formação de anticorpos, enquanto que a imunidade celular é caracterizada pela ativação dos linfócitos T. A ativação dos linfócitos T pode acontecer por duas vias. A primeira, pelas células T inflamatórias (TH1), que ativam macrófagos infectados para a destruição de patógenos intracelulares e resulta na liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), que ativarão a resposta mediada por células ; a segunda por células T auxiliares (TH2), que estimulam a produção de anticorpos (Janeway & Travers, 1997; Giraldo et al, 2000).

Mecanismos da ICM são os principais a limitar a proliferação vaginal da *Candida sp.* no hospedeiro (Fidel, 2004). Células linfóides

mononucleares, macrófagos e linfócitos parecem ser os maiores reguladores do crescimento fúngico na vagina e a CVVR parece representar uma infecção oportunista secundária a um defeito transitório da imunidade mediada (Witkin et al, 1991). As mulheres com algum defeito na ICM têm alta prevalência de vaginite por *Candida sp.* (Witkin, 1987a).

A candidíase vulvovaginal também pode se estabelecer através de uma resposta de hipersensibilidade local (Roitt & Brostoff, 1998; Giraldo et al, 2000). Esta resposta inadequada poderia bloquear a imunidade celular mediada e levar à proliferação fúngica, instalando-se o quadro de candidíase. Interessante citar a possibilidade de alguns componentes presentes no sêmen do parceiro reagirem como substâncias alérgicas (presentes nos espermicidas ou materiais lubrificantes), que, ao entrarem em contato com a mucosa vaginal, iniciem um processo alérgico e sensibilizem a mulher (Witkin et al, 1988; Witkin et al, 1998; Giraldo et al, 2000).

Importantes elementos do sistema imune são as citocinas (Forte, 2000). Citocinas são sinalizadores protéicos que atuam como mediadores da comunicação intercelular, regulando a resposta imunológica por meio da maturação, da proliferação, da diferenciação e da ativação ou inibição de diferentes células do sistema imune, aumentando ou diminuindo a resposta imune (Piccini et al, 2002; Roitt & Rabson, 2003; Forte, 2000; Fan et al, 2008).

As citocinas são classificadas segundo o tipo de ação que desenvolvem em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Entre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se a IL-1 e seu antagonista, o inibidor do receptor de IL-1 (IL1-Ra) (Arend et al, 1998; Witkin et al, 2002). As principais células produtoras de IL-1 alfa são os queratócitos, as de IL-1 beta são os monócitos e macrófagos e as de IL-1 gama, as células infectadas por vírus. Células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T também podem sintetizar IL-1. As formas IL-1 alfa e beta têm os mesmos receptores, resultando assim, em atividades semelhantes. As frações alfa e beta, por sua vez, constituem a maior parte de IL-1, sendo alfa a fração principal. A IL-1 é considerada um pirógeno endógeno, capaz de aumentar as defesas gerais pela elevação da temperatura do corpo (Roitt & Rabson, 2003). Pode iniciar uma cascata de eventos para recrutamento e ativação de macrófagos e neutrófilos, vasodilatação e febre, assim como uma resposta pró-inflamatória potente. O papel principal do sistema que envolve a IL-1 é a proteção contra qualquer injúria, desde um simples processo inflamatório até o câncer (Witkin et al, 2002).

As atividades biológicas primordiais de IL-1 alfa e beta incluem ainda a hematopoiese, com atuação na própria célula primordial, aumentando a liberação de fatores estimuladores de crescimento de colônias, com ação sinérgica a tais fatores. Além disso, atua como estimulante de células CD4 a secretarem IL-2 com proliferação de linfócitos B levando a aumento da síntese de imunoglobulina e aumentando a capacidade citotóxica dessas células. Também induz a síntese de proteínas de fase aguda da inflamação por hepatócitos.

De maneira geral a IL-1 tem sua ação regulada pela ação do antagonista de seu receptor, IL1-Ra, o qual foi o primeiro antagonista de interleucina a ser descrito. A ação inibitória do antagonista do receptor da interleucina -1 foi inicialmente descrita em cultura de monócitos de urina de paciente em pico de febre durante processo infeccioso (Arend et al, 1998).

A IL-1 Ra pertence à família da IL-1, o qual agrega-se ao receptor desta interleucina, mas sem induzir resposta intracelular. É produzida pelas células hepáticas como uma proteína de fase aguda (Arend et al, 1998). Sua presença na circulação sanguínea é baixa em situações normais, ou seja, basais, porém é elevada em indivíduos que apresentam doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes (Burger & Dayer, 2000). Acredita-se, então que sua produção é estimulada na presença de alterações inflamatórias persistentes (Arend et al, 1998).

1.3. Polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra)

Toda essa expressão imune, incluindo a secreção de citocinas, depende de constituintes genéticos predeterminados no material hereditário de cada indivíduo.

O gene é a unidade fundamental da hereditariedade. Cada gene é formado por uma sequência específica de ácidos nucleicos DNA ou RNA, ou seja, o gene é um segmento de um cromossomo, a qual corresponde um código distinto, uma informação para produzir uma determinada proteína.

O DNA é uma estrutura linear em dupla hélice, composta de duas cadeias intercaladas de materiais estruturais chamados de nucleotídeos. Cada nucleotídeo consiste em um grupamento fosfato, um açúcar desoxirribose e uma das quatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina e timina. Ao estudar as sequências de DNA do genoma humano, verificou-se que muitos genes eram polimórficos. O termo polimorfismo vem do grego *poly*, significando muitos e *morpho*, significando forma ou estrutura, ou seja, há variação num único loco ou lugar genético. Assim, uma simples troca ou repetição de uma base nitrogenada de um nucleotídeo pode modificar a expressão da proteína codificada pelo gen; tal alteração pode desencadear severas desordens patológicas (Witkin et al, 2002).

Em um gene eucariótico há uma região reguladora no qual várias proteínas se ligam, fazendo com que ocorra a transcrição no momento oportuno. Às vezes a sequência codificante de proteína é interrompida por segmentos chamados de íntrons, cujas funções ainda são discutíveis. As sequências intercaladas pelos íntrons são chamadas de éxons, ou seja, entre dois éxons existe um íntron na sequência. A maior parte dos genes polimórficos codifica proteínas que variam em apenas um ou em poucos aminoácidos, mas que diferem em sobremaneira em suas funções, facilitando recorrência de algumas doenças.

Um gene polimórfico que vem recebendo especial atenção é o gene que codifica o antagonista do receptor da IL-1. Este gene está locado no cromossomo 2 próximo aos genes codificantes para IL-1alfa e IL-1 beta, os

quais são os principais indutores de respostas imunes pró-inflamatórias (Dinarello, 1996.)

Polimorfismos no gene que codifica o IL1-Ra foram descritos sendo associados a algumas doenças como colite ulcerativas, *alopecia areata*, lesões cutâneas em lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves e manifestações de neuropatia periférica por diabetes *mellitus* (Arend et al, 1998), doença de Kawasaki (Wu et al, 2005), parto prematuro (Chaves et al, 2008) e na carcinogênese de diferentes tumores sólidos malignos como o câncer de ovário (Sehouli et al, 2003) e câncer cervical (Tamandani et al, 2008). Os mecanismos, porém, pelos quais isso acontece ainda são obscuros.

Recentemente houve grande interesse no estudo de outra proteína constituinte do sistema imune natural ou inato, a lectina ligadora de manose (*mannose-binding lectin*, MBL). Tal proteína é secretada pelo fígado e possui a habilidade de agregar-se a várias estruturas de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. Tem papel importante na imunidade inata e possivelmente existe uma relação na sua deficiência e aparecimento de algumas doenças (Liu et al, 2006; Babula et al, 2003; DeSeta et al, 2007; Donders et al, 2002).

A MBL é encontrada no soro normal em níveis baixos, mas também é produzida em quantidades aumentadas durante a resposta de fase aguda. Como citado anteriormente, é ligadora de açúcar ou lectina, membro de uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, conhecidas como colectinas.

A MBL foi isolada pela primeira vez em soro de coelhas em 1970. Foi também isolada na vagina e parece reconhecer resíduos de N-acetilglucosamina, um açúcar presente na superfície de microrganismos (Gadjeva et al, 2004). Assim, também pode ativar o sistema complemento contra infecção fúngica, o que lhe confere papel protetor (Babula et al, 2003; Babula et al, 2005; Liu et al, 2006; Milanese et al, 2008).

O gene codificante para a MBL é polimórfico, ou seja, apresenta-se em diferentes formas. Isso resulta na diminuição da síntese da proteína e também na produção de uma proteína instável. Portanto, em presença do polimorfismo, ocorrem concentrações mais baixas na circulação e na vagina, além de prejuízo na atividade devido à instabilidade da proteína (Milanese et al, 2008).

O gene codificante para a lecitina ligadora de manose apresenta três polimorfismos funcionais no *exon* 1 (Segat et al, 2007). O polimorfismo no códon 54 é o mais comum entre a população da raça branca. O polimorfismo no códon 57 está presente com maior frequência na raça negra enquanto que o polimorfismo no códon 52 é menos frequente em aproximadamente 5% em ambas as populações (Babula et al, 2003; Giraldo et al, 2007).

O decréscimo da lecitina ligadora de manose circulante parece estar relacionada ao aumento de várias doenças sistêmicas como o lúpus eritematoso (Huang et al, 2003), colite ulcerativa, artrite reumatóide (Ip et al, 2000), doença celíaca, Síndrome de Sjögren e doenças infecciosas, como aumento na frequência de candidíase em determinadas mulheres (Boniotto et al, 2005).

Estudo recente demonstrou que a deficiência da proteína MBL devido ao polimorfismo no códon 54 levou a um aumento significativo de recorrência de vulvovaginite fúngica em mulheres na Latvia e em mulheres chinesas, demonstrando a importância da MBL como fator protetor vaginal (Babula et al, 2003; Liu et al, 2006). A preocupação com as consequências físicas e emocionais da candidíase vulvovaginal recidivante nas mulheres e a pesquisa de tratamentos mais adequados para esta afecção têm motivado os investigadores na busca de novos elementos relacionados à sua fisiopatologia. Diversos estudos têm demonstrado a importância do sistema imune no aparecimento e no controle das recorrências. Assim, no presente estudo procurou-se avaliar as correlações entre os polimorfismos nos genes que codificam a lectina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1- Ra), respectivamente, e a presença de candidíase vulvovaginal recidivante em mulheres brasileiras.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar a frequência do polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose (MBL) e no gene que codifica o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1 Ra), respectivamente, em mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente, comparadas a mulheres saudáveis.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo tipo caso-controle.

3.2. TAMANHO AMOSTRAL

Baseado na prevalência do genótipo selvagem do polimorfismo no códon 54 (MBL) em mulheres saudáveis de 84% e intervalo de confiança de 95% e poder de 80%, espera-se encontrar um percentual máximo de genótipo selvagem em mulheres com candidíase recidivante de 62%. Tendo essa diferença como interesse, o número necessário de mulheres em cada grupo para realização do presente estudo é de 60. O cálculo da amostra segue metodologia descrita em Fischer & Van Belle, 1993.

3.3. CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp (anexo 1) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (anexo 2).

Foram estudadas 100 mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recidivante atendidas no Setor de Imunologia, Genética e Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo A - estudo). Todas as

pacientes apresentavam história de candidíase vaginal recidivante caracterizada por, pelo menos, quatro episódios de candidíase vulvovaginal comprovados clínica e laboratorialmente no período de 1 ano.

Como grupo controle (grupo B) foram estudadas 100 mulheres atendidas no mesmo setor ou em outros setores da Disciplina de Ginecologia que não apresentavam história de candidíase vulvovaginal recidivante.

Os dois grupos (A e B) foram constituídos por mulheres com características epidemiológicas semelhantes

Adotou-se os seguintes critérios de inclusão:

- Vida sexual ativa;
- Menacme.

Como critérios de exclusão foram considerados:

- Uso de antimicrobiano nos 30 dias que precederam a coleta do material;
- Uso de dispositivo intra-uterino;
- Gestação;
- Diabetes *mellitus*;
- Presença de neoplasias malignas;
- Soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana;
- Doenças auto-imunes;
- Uso de anticoncepcionais orais combinados cuja dose de etinilestradiol fosse maior ou igual a 0,03mg e a de progestogênio maior ou igual a 0,15 mg.

3.4. MÉTODO

3.4.1. Método de estudo

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido- TCLE (anexo 3), as pacientes foram submetidas a anamnese e exames físico e ginecológico, onde foi coletada a citologia oncológica cervicovaginal.

A seguir foi solicitada a coleta de exames microbiológicos, constando de cultura para fungos em meio específico (Saburroaud) e realização de esfregaço para bacterioscopia com coloração pelo método de Gram. Solicitou-se ainda pesquisa por PCR para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Os exames foram coletados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A seguir, realizou-se a coleta de células bucais para a obtenção do material para análise genética. Tais células foram colhidas por meio de um swab de algodão (*Foam-tip buccal cell collection swab-catch ALL TM Sample Collection Swab Epicentre Madison W153713 USA*), que gentilmente foi pressionado e rodado na parte interna das bochechas.

Este material foi mantido a -20° e após foi enviado a *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University* para análise do polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose e o polimorfismo no gen que codifica o antagonista do receptor da interleucina 1(IL1-Ra), no ítron 2.

3.4.2. Descrição da leitura

O DNA foi extraído de células da mucosa coletadas através de *swabs* bucais, conforme descrito anteriormente. As amostras foram descongeladas e microcentrifugadas por 8 minutos, a 12.000 rpm (o concentrado é o foco para análise do DNA).

O sobrenadante foi lavado por 3 vezes com 250-400 ml de PBS; preparado os tubos foram preparados e numerados. Adicionou-se 1 gota de óleo mineral a cada tubo, seguido de 10 ml de proteinase K (PK) aos mesmos tubos. As células foram lisadas por incubação a 56°C por 60 minutos e a proteinase K foi então inativada, aumentando-se a temperatura para 96 °C por 10 minutos.

Os reagentes para a reação de PCR estavam guardados a -70 °C no freezer; para o descongelamento foram colocados à temperatura ambiente por 20 minutos.

Adicionou-se às amostras 10mmol/l Tris- ácido hidroclicorico que continha 1.5 mmol/l MgCl₂;50mmol/l KCl;0.2 mmol/l de: trifosfato deoxiadenosina, trifosfato deoxytidina, trifosfato deoxyguanosina, trifosfato timidina;1.25 unidades de Taq polimerase e 30 pmol de *primers* específicos (que amplificam a região em questão). As amostras foram incubadas em ciclo térmico.

Primers oligonucleotídeos para o gene do MBL:

5`AGA ATT CGT AGG ACA GAG GGC ATG CTC-3`

Primers oligonucleotídeos para o gene do IL1-Ra:

5`CTC AGC AGC AAC ACT CCT ATT-3`

Os produtos da reação de PCR foram lidos através de eletroforese em gel agarose a 3% marcados com etil bromídio.

3.4.3. Definição de variáveis

- **Idade:** número de anos completos na data do exame;
- **Etnia:** branca, negra, amarela e parda;
- **Escolaridade:** fundamental, médio, superior e pós- graduação;
- **Idade da primeira relação sexual;**
- **Paridade:** número de partos vaginais ou de cesárias com gestações superiores a 20 semanas;
- **Número de abortos:** número de perdas gestacionais com 20 semanas ou menos;
- **Antecedente de DST:** positivo ou negativo, conforme relato da paciente;
- **Método contraceptivo:** método contraceptivo adotado pela paciente nos últimos seis meses - nenhum, ACO (contraceptivo oral hormonal), ACI (contraceptivo injetável), barreira (condom masculino ou feminino) e LTB (laqueadura bilateral) ou vasectomia (masculina). Uso de condom masculino: frequente, ocasionalmente (raras vezes) e negativo (nunca houve uso);

- **Tipo de flora vaginal na bacterioscopia do conteúdo vaginal com coloração pelo método de Gram** (Bozzini, 1993; Linhares et al, 1995):

Flora tipo I: presença de células epiteliais, raros polimorfonucleares ou ausência destes. Flora bacteriana representada por 90% a 95% de *Lactobacilos de Doderlein* e 5 a 10% por outros gêneros bacterianos;

Flora tipo II: presença de células epiteliais ,raros ou moderados polimorfonucleares; flora bacteriana representada por cerca de 50% de *Lactobacilos de Doderlein* e 50% por outros gêneros bacterianos;

Flora tipo III: presença de células epiteliais, raros polimorfonucleares, flora bacteriana com 5% ou menos de *Lactobacilos de Doderlein* e 95% ou mais de outros gêneros bacterianos.

- **Citologia oncótica cervicovaginal:** conforme classificação de Papanicolaou.

A coleta foi realizada durante o exame ginecológico, após colocação de espéculo vaginal. Utilizou-se espátula de Ayre (de madeira) para coleta de amostra do raspado do epitélio escamoso e de parede vaginal e uso do *citobrush* (escova) para amostra do epitélio glandular. O conteúdo foi disposto em forma de esfregaço em lâmina de vidro e fixado em álcool etílico absoluto de uso comercial para futura leitura sob coloração de Papanicolaou realizada no Laboratório de Citopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5. Método estatístico

As medidas quantitativas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média e desvio padrão) e comparadas entre os grupos com uso de testes t - Student. As medidas qualitativas foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e realizados testes de associação qui-quadrado para verificar existência de associação entre os grupos e as medidas de interesse.

Foi utilizado *Statistical Package for the Social Sciences* versão 15.0.

O poder de significância foi estabelecido em 5%.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 ilustra as variáveis de idade, raça e antecedentes de DST.

Em relação à idade e à raça não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Porém, em relação às DST houve incidência maior no grupo estudo, sendo 15 (15%) casos de HPV; 5 (5%) de *Chlamydia trachomatis* e 3 (3%) de herpes genital.

Tabela 1. Características gerais e antecedentes de DST de mulheres com e sem CVVR

	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Idade média	32,43	29,91	0,015
Raça			
Branca	84%	83%	
Negra	10%	9%	
Amarela	6%	3%	
Parda	0%	5%	
Antecedentes de DST	16%	0%	<0,001

A Tabela 2 ilustra o grau de instrução de ambos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 2. Escolaridade referida pelas mulheres com e sem CVVR

Grau de instrução	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Fundamental	14%	9%	0,228
Médio	47%	48%	
Superior	37%	43%	
Pós-graduação	2%	0%	

Com relação ao início da atividade sexual, não foi encontrada diferença significativa entre as médias da idade da primeira relação sexual, sendo 17,5 anos no grupo com candidíase vulvovaginal recorrente e 18,1 anos no grupo controle.

Em relação aos antecedentes obstétricos observa-se na Tabela 3 maior frequência da nuliparidade no grupo B, enquanto que no grupo A, a multiparidade foi mais frequente. Tais diferenças foram estatisticamente significativas.

Tabela 3. Antecedentes obstétricos das mulheres com e sem CVVR

Paridade	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Nulípara	51 %	70 %	<0,001
Primípara	13 %	20 %	
Múltipara	36 %	10 %	

A Tabela 4 ilustra os métodos contraceptivos adotados nos dois grupos analisados.

Observa-se diferença significativa no uso do método de barreira (condom masculino), sendo maior entre as mulheres do grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao uso dos demais métodos.

Observou-se ainda que 14% das mulheres com CVVR não utilizavam método contraceptivo, quando comparadas às mulheres saudáveis (3%). Tal diferença foi estatisticamente significativa.

Tabela 4. Distribuição dos diferentes métodos anticoncepcionais adotados pelas mulheres com e sem CVVR

MAC	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Nenhum	14%	3%	<0,001
Hormonal	50%	33%	
Barreira	30%	61%	<0,001
Esterilização Tubária	5%	1%	
Vasectomia	1%	0%	
Comportamental	0%	2%	

A Tabela 5 ilustra os sintomas apresentados pelas pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente, sendo os mais frequentes: corrimento, queimação e prurido.

Tabela 5. Sintomas referidos pelas pacientes com CVVR

Sintoma	Presente n = 100	Ausente n = 100
Corrimento	98%	2%
Queimação	89%	11%
Prurido	92%	8%
Disúria	17%	83%
Dispareunia	44%	56%
Dor pélvica	16%	84%

Os dados do exame ginecológico das mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente encontram-se representados na Tabela 6.

Os sinais mais expressivos foram o aumento do conteúdo vaginal presente em 98% e a mácula rubra em 28% dos casos, respectivamente.

Tabela 6. Achados do exame ginecológico em pacientes com CVVR

Sinais clínicos	Presente n = 100	Ausente n = 100
Aumento do conteúdo vaginal	98%	2%
Úlcera genital	0%	0%
Tumoração	0%	0%
Mácula rubra	28%	72%

A Tabela 7 ilustra o tipo de flora vaginal encontrado nos dois grupos estudados. A flora do tipo I foi a mais frequente no grupo B. Tal achado foi estatisticamente significativo.

Tabela 7. Tipo de flora vaginal segundo a bacterioscopia pelo método de Gram nas pacientes com e sem CVVR

Tipo de flora	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Flora tipo I	3%	30%	<0,001
Flora tipo II	89%	70%	
Flora tipo III	8%	0%	

A Tabela 8 ilustra os resultados da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou.

Observa-se que o grupo com CVVR apresenta maior frequência (15%) de citologia classe III, quando comparadas com o grupo de mulheres saudáveis. Tal resultado foi estatisticamente significativo.

Tabela 8. Resultado da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou

Papanicolaou	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
CLASSE I	0%	8%	<0,001
CLASSE II	85%	92%	
CLASSE III	15%	0%	

A Tabela 9 ilustra o número de parceiros sexuais nos últimos seis meses de ambos os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9. Número de parceiros sexuais nos últimos seis meses referidos pelas pacientes com e sem CVVR

Número de parceiros sexuais	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Um parceiro	95%	91%	0,338
Dois parceiros	5%	8%	
Três parceiros	0%	1%	
Quatro ou mais parceiros	0%	0%	

A Tabela 10 ilustra a frequência do polimorfismo no códon 54 do gen que codifica a lecitina ligadora de manose. Observa-se que a prevalência do genótipo AA (selvagem) foi mais elevada no grupo controle do que no grupo estudo (CVVR), oposto do observado com a prevalência do genótipo BB, o qual foi maior no grupo estudo (CVVR).

Ao observar separadamente os alelos A e B, verifica-se diferença estatisticamente significativa, sendo que o alelo A é mais prevalente no grupo controle. Quanto ao alelo B, o qual sinaliza para o genótipo polimórfico, há maior prevalência no grupo estudo (CVVR).

Tabela 10. Polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL em mulheres com e sem CVVR

Genótipo	Alelo	Grupo A n=100	Grupo B n=100
A,A		58 (58%)	84 (84%) ^a
A,B		30 (30%)	15 (15%)
B,B		12 (12%)	1 (1%) ^b
	A	146	183
	B	54 (27,0%)	17 (8,5%) ^c

^ap = <0,0001, razão de chance (OR) = 0,2630, 95% intervalo de confiança (CI) = 0,1351, 0,5121; ^bp = 0,0025, OR = 13,5, 95% CI = 1,720, 105,9; ^cp = <0,0001, OR = 3,981, 95% CI = 2,214, 7,161

A Tabela 11 ilustra a frequência do polimorfismo do gene que codifica a IL1-Ra em mulheres com CVVR. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os diferentes polimorfismos entre os dois grupos.

Tabela 11. Polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra em mulheres com e sem CVVR

Genótipo	Alelo	Grupo A n=75	Grupo B n=75
1,1		43 (57,3%)	45 (60,0%)
1,2		20 (26,7%)	21 (28,0%)
1,3		3 (4,0%)	1 (1,3%)
1,4		1 (1,3%)	0
2,2		8 (10,7%)	6 (8,0%)
2,3		0	1(1,3%)
2,4		0	1 (1,3%)
	1	110 (73,3%)	112 (74,7%)
	2	36 (24,0%)	35 (23,4%)
	3	3 (2,0%)	2 (1,3%)
	4	1 (0,7%)	1 (0,7%)

A Tabela 12 ilustra as associações entre os polimorfismos nos genes que codificam o IL-1Ra e MBL nas pacientes com CVVR. Observa-se menor frequência dos genótipos AA da MBL e 1,1 da IL1-Ra no grupo das mulheres com CVVR em relação ao grupo controle. Tais resultados foram estatisticamente significativos. Observa-se também diferença significativa nos genótipos A,B da MBL e 1,1 da IL-Ra no grupo estudo quando comparado ao grupo controle.

Tabela 12. Polimorfismo dos genes que codificam a MBL e o IL-Ra em mulheres com e sem CVVR

Genótipos		Grupo A n=75	Grupo B n=75
MBL	IL-1Ra		
A,A	1,1	24 (32,0%) ^a	42 (56,0%)
A,A	1,2	13 (17,3%)	15 (20,0%)
A,A	1,3	0	1 (1,3%)
A,A	1,4	1 (1,3%)	0
A,A	2,2	5 (6,7%)	4 (5,3%)
A,B	1,1	16 (21,3%) ^b	2 (2,7%)
A,B	1,2	6 (8,0%)	8 (10,7%)
A,B	1,3	3 (4,0%)	0
A,B	2,2	0	2 (2,7%)
B,B	1,1	3 (4,0)	1 (1,3%)
B,B	1,2	2 (2,7%)	0
B,B	2,2	2 (2,7%)	0

^ap = 0,0050 vs. razão de chance = 0,3697, 95% intervalo de confiança= 0,1900, 0,7196

^bp = 0,0007 vs. razão de chance = 9,898, 95% intervalo de confiança = 2,187, 44,801

Pode-se observar na Tabela 13 a relação entre os sintomas apresentados pelas mulheres com CVVR e o polimorfismo no gen que codifica a MBL. O alelo B foi mais frequente em mulheres com queixas de dor pélvica, quando comparadas às mulheres sem esta queixa, sendo tal diferença estatisticamente significativa.

Tabela 13. Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Queimação	AA		50 (56,8%)	6 (60,0%)
	AB		29 (33,0%)	1 (10,0%)
	BB		9 (10,2%)	3 (30,0%)
		A	129 (73,3%)	13 (65,0%)
		B	47 (26,7%)	7 (35,0%)
Prurido	AA		50 (54,9%)	7 (87,5%)
	AB		30 (33,0%)	0
	BB		11 (12,1%)	1 (12,5%)
		A	130 (71,4%)	14 (87,5%)
		B	52 (28,6%)	2 (12,5%)
Dispareunia	AA		29 (65,9%)	28 (50,9%)
	AB		10 (22,7%)	20 (36,4%)
	BB		5 (11,4%)	7 (12,7%)
		A	68 (77,3%)	76 (69,1%)
		B	20 (22,7%)	34 (30,9%)

continua

Tabela 13. Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR (conclusão)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Dor pélvica	AA		12 (75,0%)	44 (53,7%)
	AB		4 (25,0%)	26 (31,7%)
	BB		0	12 (14,6%)
		A	28 (87,5%)	114 (69,5%)
		B	4 (12,5%)	50 (30,5%) ^a
Disúria	AA		7 (46,7%)	49 (59,8%)
	AB		7 (46,7%)	22 (26,8%)
	BB		1 (6,7%)	11 (13,4%)
		A	21 (70,0%)	120 (73,2%)
		B	9 (30,0%)	44 (26,8%)

^aP = 0,05 vs. dor pélvica, razão de chance = 3,070, 95% intervalo de confiança = 1,023, 9,218

A Tabela 14 ilustra as relações das principais queixas ginecológicas referidas pelas pacientes com CVVR com o polimorfismo no gene que codifica o IL-1Ra. Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas.

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Queimação	1,1		39 (5,4)	4 (50,0)
	1,2		19 (27,9)	2 (25,0)
	1,3		2 (2,9)	1 (12,5)
	2,2		8 (1,8)	0
	1,4		0	1 (12,5)
		1	99 (72,8)	12 (75,0)
		2	35 (25,7)	2 (12,5)
		3	2 (1,5)	1 (6,3)
		4	0	1 (6,3)
Prurido	1,1		42 (58,3)	2 (40,0)
	1,2		19 (26,4)	2 (40,0)
	1,3		3 (4,2)	0
	2,2		8 (11,1)	0
	1,4		0	1 (20,0)
		1	6 (73,6)	7 (70,0)
		2	35 (24,3)	2 (20,0)
		3	3 (2,1)	0

continua

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR (continuação)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Dispareunia	1,1		17 (53,1)	27 (60,0)
	1,2		11 (34,4)	10 (22,2)
	1,3		0	3 (6,7)
	2,2		4 (12,5)	4 (8,9)
	1,4		0	1 (2,2)
		1	45 (70,3)	68 (75,6)
		2	19 (29,7)	18 (20,0)
		3	0	3 (3,3)
		4	0	1 (1,1)
Dor pélvica	1,1		7 (50,0)	37 (58,7)
	1,2		6 (42,8)	15 (23,8)
	1,3		0	3 (5,1)
	2,2		1 (7,1)	7 (11,1)
	1,4		0	1 (1,6)
		1	20 (71,4)	93 (73,8)
		2	8 (28,6)	29 (23,0)
		3	0	3 (2,4)
		4	0	1 (0,8)

continua

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR (conclusão)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Disúria	1,1		7 (50,0)	36 (58,1)
	1,2		4 (28,6)	17 (27,4)
	1,3		2 (14,3)	1 (1,6)
	2,2		1 (7,1)	7 (11,3)
	1,4		0	1 (1,6)
		1	20 (71,4)	91 (73,4)
		2	6 (21,4)	31 (25,0)
		3	2 (7,1)	1 (0,8)
		4	0	1 (0,8)

5. DISCUSSÃO

As vulvovaginites representam uma das principais causas que levam as pacientes a procurar ajuda médica nos ambulatórios e clínicas ginecológicas. Dentre estas, a candidíase vulvovaginal é uma das mais frequentes, sendo a *Candida sp.* o agente etiológico.

As recidivas ocorrem em aproximadamente 5% dos casos.

As mulheres que apresentam episódios recorrentes de candidíase vulvovaginal têm uma qualidade de vida ruim, afetando todos os aspectos: pessoal, profissional, social, financeiro e sexual. Para muitas mulheres esses episódios ocorrerão durante grande parte de suas vidas no menacme, ou seja, período de maior potencial físico, emocional, intelectual e reprodutivo, obrigando-as ao uso intermitente de antifúngicos orais e vaginais (Sobel, 1992).

No presente estudo a média etária da população estudada foi semelhante nos dois grupos, sendo 32,43 anos nas mulheres que apresentaram CVVR e 29,91 anos nas mulheres saudáveis.

A raça predominante foi a branca em 80% dos casos tanto no grupo estudo quanto no grupo controle. Tais dados foram semelhantes aos encontrados por Giraldo et al (2007), que encontrou a média de 31,5 anos para o grupo de mulheres com CVVR e 33,5 anos no grupo controle, respectivamente.

Com relação aos antecedentes de DST, observou-se maior prevalência (16%) no grupo de pacientes com CVVR. Tais resultados foram

estatisticamente significantes. Interessante notar que as DST foram representadas por *Chlamydia trachomatis* (5%) e HPV (15%), doenças que requerem a imunidade celular (TH1) para combatê-las. Embora a CVVR não tenha seus mecanismos fisiopatogênicos totalmente elucidados, não existe dúvida da importância da imunidade celular. Talvez a infecção concomitante por *Chlamydia trachomatis* e HPV pudessem de alguma maneira, comprometer a defesa do trato genital, permitindo a proliferação dos fungos e conseqüentemente o aparecimento das recorrências.

Ao analisar o grau de instrução, ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas. Um aspecto que chama a atenção, onde duas mulheres pertencentes ao grupo de CVVR eram pós graduadas. Embora este número seja pequeno, levou-se em consideração a possibilidade do “stress” afetar o estado imune com conseqüente redução da imunidade local, permitindo o desenvolvimento da *Candida sp*, desencadeando o processo infeccioso.

Não houve diferença significativa na média das idades da primeira relação sexual entre os dois grupos, sendo a média entre 17,5 e 18,1 anos, respectivamente.

Em relação aos antecedentes obstétricos observou-se maior frequência de multiparidade no grupo com CVVR (36%) quando comparadas a mulheres saudáveis (10%). Aventou-se a possibilidade de que, embora a assistência ao parto tenha evoluído, oferecendo melhores condições às parturientes, as próprias modificações gravídicas locais e lacerações do colo uterino, assim como as alterações da flora vaginal e possível instabilidade do

sistema imune do trato genital poderiam contribuir para a instalação de processo inflamatório e eventualmente levar à alteração da imunidade celular local. Tais fatos poderiam explicar o maior número de múltiparas no grupo estudo.

Com relação aos métodos contraceptivos, observou-se que apenas 30% das mulheres com CVVR utilizam método de barreira. Embora a CVVR não seja considerada doença de transmissão sexual, o sexo desprotegido pelo uso de outros métodos expõe o trato genital inferior à ação supressora do sêmen, além de agentes sexualmente transmissíveis. Assim, mulheres com deficiências específica na imunidade do trato genital estariam mais sujeitas à proliferação de fungos, que passariam do estado saprófita para o estado de microrganismos causadores de infecção.

Alguns estudos já demonstraram que a presença do sêmen na vagina pode desencadear processo alérgico inibindo a imunidade celular local. Sabe-se que a produção de prostaglandina E₂ induzida pela alergia ao sêmen ou a uma variedade de outros alérgenos, possui ação inibitória potente sobre a imunidade celular, prevenindo a ativação dos linfócitos e assim inibindo a imunidade anticândida (Witkin, 1987b). O sêmen também induz a produção de interleucinas que podem inibir a ativação de macrófagos responsáveis pelo fenômeno de fagocitose fúngica (Witkin et al, 1998; Jeremias et al, 1998).

Por outro lado Giraldo et al (2000) e Witkin et al (2002) ressaltaram o fato de que tais mecanismos de hipersensibilidade local podem resultar em

sintomas genitais semelhantes aos sintomas encontrados nas infecções fúngicas e que podem, por vezes, confundir o diagnóstico.

Em concordância com os estudos realizados por Nyirjesy et al, (2001); Liu et al, (2006); Fan et al, (2008) verificou-se no presente trabalho que as queixas mais frequentes das mulheres do grupo que apresentava CVVR foram: corrimento (96%), prurido (92%) e queimação (89%). Em menor frequência foram referidas dispareunia (44%) e dor pélvica (16%) e disúria (17%). Tais sintomas provavelmente devem-se ao processo inflamatório associado à candidíase vulvovaginal recorrente.

Dentre os sinais encontrados durante o exame ginecológico, além do aumento do conteúdo vaginal, destaca-se a presença de mácula rubra, eversão do epitélio glandular, que ocorre na maioria das vezes em resposta a um meio hostil. Tal alteração foi encontrada em 28 (28%) pacientes que apresentavam CVVR. Importante lembrar que mulheres jovens portadoras de mácula rubra tem maior possibilidade de apresentarem infecção por *Chlamydia trachomatis*. Assim em presença da CVVR poderia ser sugerida a pesquisa de tal bactéria.

O tipo de flora vaginal predominante nas mulheres com CVVR foi o tipo II (89%) dos casos, onde foram encontrados 50% de *Lactobacillus de Doderlein* e 50% de outros gêneros bacterianos. Embora não fosse objetivo deste estudo analisar as diferentes cepas de *Lactobacillus* e relacioná-los com a CVVR, talvez tais diferenças possam explicar as correlações dos mesmos com a infecção fúngica.

No que se refere a citologia oncológica cervico vaginal, 85% das mulheres com quadros recidivantes de candidíase vulvovaginal apresentaram classe II segundo a classificação de Papanicolaou, ou exame satisfatório, porém negativo para neoplasia, segundo classificação de Bethesda; 15% apresentaram classificação III de Papanicolaou e suspeito na classificação por Bethesda, e apenas 1% apresentou classificação I de Papanicolaou e negativo segundo Bethesda. Portanto, os resultados no presente estudo sugerem que a infecção pela *Candida sp* não está associada com alterações intra epiteliais relevantes.

Entretanto, a presença de classe III em 15% das pacientes com CVVR mais uma vez aponta para a possibilidade de associação com agentes sexualmente transmissíveis, neste caso o HPV.

Ambos os grupos mostraram-se homogêneos com relação ao número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, referindo quase que na totalidade um único parceiro até o momento da pesquisa. Segundo alguns estudos parece que o parceiro sexual não desempenha papel relevante nas recidivas das candidíases. Nyirjesy et al (1995), em seu estudo demonstraram que os parceiros das mulheres com CVVR apresentavam em sua maioria cultura negativa para fungos, assim não sendo provavelmente, a fonte das reinfecções. Além disso, o tratamento dos parceiros não diminuiu as recorrências da candidíase em suas parceiras.

Alguns autores tem ressaltado a importância do sistema imune na gênese da candidíase vulvovaginal recorrente. A tendência da maioria dos estudos é centralizar a participação do sistema imune no processo de

repetição da infecção vaginal fúngica (Witkin, 1987b; Witkin et al, 1988; Witkin et al, 2000; Fidel, 2005; Giraldo et al, 2007).

Os mecanismos das respostas imunes, tanto o da inata quanto o da adquirida, constituem um sistema integrado complexo de defesa do hospedeiro, envolvendo inúmeras células, constituintes protéicos e mediadores químicos específicos. A formação, regulação, liberação e atividade de tais elementos é geneticamente determinada.

Por outro lado, cada vez mais tem sido ressaltado a importância da constituição genética de cada indivíduo, onde simples trocas de um único nucleotídeo por outro, na constituição de determinado gen, levaria a formação de uma proteína instável e resultaria em algum dano à saúde (Witkin et al, 2002). Os polimorfismos, ou seja as diferentes formas que o gene pode se apresentar, responderiam a algumas dúvidas sobre diversas doenças.

Estudos prévios tem demonstrado que a lecitina ligadora de manose (MBL) apresenta papel importante na defesa contra a vulvovaginite fúngica, fazendo parte da primeira linha de defesa contra a proliferação pela *C. albicans*. A deficiência em tal proteína tem sido associada à candidíase vulvovaginal recorrente (Witkin et al, 2000).

Mesmo entre indivíduos saudáveis com genótipos semelhantes, a concentração de MBL no plasma pode variar e elevados níveis são encontrados durante vigência de quadros infecciosos ou após atos cirúrgicos ou outras injúrias que o indivíduo possa sofrer (Jensenius et al, 2003).

No presente estudo observou-se que o genótipo AA (selvagem) esteve presente em 58% das mulheres com CVVR e em 84% dos controles. Tal diferença foi estatisticamente significativa, ressaltando a importância da secreção adequada de MBL na proteção contra as infecções fúngicas.

De maneira semelhante verificou-se que a prevalência do genótipo BB foi de 12% no grupo com CVVR e de apenas 1% no grupo controle. Tais achados reforçam ainda mais a importância da MBL, como fator de proteção, já que o genótipo BB está associado a deficiência na produção proteína normal e portanto, falha nas defesas contra os fungos.

Na década de 90, alguns pesquisadores vislumbraram a possibilidade da produção de MBL para intervenção terapêutica na candidíase vulvovaginal recorrente. Obtiveram resultados encorajadores com MBL purificado (Jensenius et al, 2003).

Outro importante componente do sistema imune é a Interleucina 1 (IL-1) que se destaca entre as citocinas pró inflamatórias. O antagonista do receptor desta interleucina (IL1-Ra) é estimulado na presença de alterações inflamatórias persistentes, já que inflamação persistente pode ser prejudicial ao organismo. O IL1-Ra é inibidor competitivo da bioatividade da IL1 (Witkin et al, 2002).

A relação entre IL1 e seu inibidor, a IL1Ra sinalizarão para resposta inflamatória persistente ou para o término deste processo, impedindo que o mesmo se torne crônico. O polimorfismo no gene que codifica para IL1Ra parece desempenhar papel importante no desenvolvimento de várias doenças, tais como colite ulcerativa, *alopecia areata*, lesões cutâneas no

lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves e outras (Arend et al, 1998; Witkin et al, 2002; Sehouli et al, 2003; Wu et al ,2005).

Até o presente momento não foram encontrados na literatura dados correlacionando a CVVR e o polimorfismo no gene que codifica para IL1- Ra. Assim, neste estudo procurou-se relacionar pela primeira vez, o polimorfismo de tal gene às recidivas de vulvovaginite por *Candida sp* em mulheres brasileiras.

Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas no polimorfismo do gene que codifica o antagonista do receptor da interleucina 1 no grupo de mulheres com CVVR e no grupo controle. Assim, embora sejam necessários maiores estudos, pode-se inferir que tal citocina não desempenha papel importante na defesa contra a CVVR.

Ao estudarmos a associação de ambos os polimorfismos: do gene que codifica para o antagonista do receptor da interleucina 1 e do gene que codifica para a lectina ligadora de manose com CVVR, observamos menor frequência dos genótipos AA da MBL e 1,1 da IL1-ra no grupo das mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente em relação ao grupo controle. Ao mesmo tempo observa-se maior frequência dos genótipos AB da MBL e 1,1 da IL1-Ra no grupo estudo quando comparadas às mulheres saudáveis. Tais diferenças foram estatisticamente significantes, levando-nos a pensar que a ação da MBL seja mais marcante e “forte” do que a influência da IL1-Ra no processo da candidíase vulvovaginal recorrente.

Além do papel protetor que a MBL desempenha contra a CVVR, esta proteína também parece inibir infecção por *Chlamydia trachomatis*. Swanson

& Kuo (1991) observaram que a MBL ligava-se ao grupo açúcar presente na membrana desta bactéria em cultura de células. Sziller et al (2007), em estudo realizado com mulheres húngaras, demonstraram que o alelo heterozigoto B da MBL estava fortemente associado com a oclusão da tuba de Falópio e que mulheres que apresentavam alelo selvagem A estavam protegidas contra danos tubários.

No presente estudo observou-se menor prevalência do alelo B em mulheres com CVVR que tinham queixa de dor pélvica. Tal fato sugere que a deficiência da MBL, devido ao alelo B, poderia tornar a mulher mais susceptível à ascensão de microrganismos do trato genital inferior para o trato genital superior causando processo inflamatório e consequentemente dor pélvica.

Talvez ampliando-se o estudo, aumentando o número de pacientes e de controles, ou estudando outros polimorfismos relacionados ao sistema imune, seja possível vislumbrar outros caminhos para elucidar os mecanismos envolvidos nos processos crônicos, o que possibilitaria medidas preventivas e de terapêutica. Tais fatos sem dúvida trariam de volta a qualidade de vida que muitas de nossas pacientes perderam e almejam tanto ter de volta. Assim este trabalho abre outros caminhos para novas pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente apresentaram maior frequência de polimorfismos no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose (MBL) quando comparadas a mulheres saudáveis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência do polimorfismo do gene que codifica o inibidor do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra) entre os grupos estudados.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Memo.CAPPesq - 096/06

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Ilma. Sra.
Dra. Lana Maria Aguiar
DD. Pesquisador
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Por determinação do Senhor Presidente,
Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho, encaminhamos para conhecimento,
cópia do parecer nº 677/2006, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CONEP/MS referente à APROVAÇÃO do protocolo de Pesquisa nº
558/04 - intitulado " Avaliação imunológica de pacientes portadoras de
candidíase vulvovaginal".

Solicitamos observar as recomendações constantes
no referido parecer. (Só se tiver recomendações!!)

Atenciosamente,

MARCIA APARECIDA T. DE CARVALHO

Secretária

Comissão de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2

06/21/2006 18:18 0512266453

CONEP

PAGE 01

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 677/2006

Registro CONEP: 12583 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0457.0.015.000-04

Processo nº 25000.200559/2005-81

Projeto de Pesquisa: "Avaliação Imunológica de Pacientes Portadores de Candidíase Vulvovaginal".

Pesquisador Responsável: Dra. Lana Maria Aguiar

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: Não se aplica (colaboração da Universidade de Cornell/EUA)

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 181/2006, cabem as seguintes considerações:

- Foi apresentado compromisso com a Res. CNS 347/2005, quanto ao armazenamento de material biológico e importância desse procedimento para a instituição brasileira.
- Esclarecimentos metodológicos também foram incorporados ao protocolo.
- Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, a pesquisadora fez as alterações solicitadas, contudo o título "Consentimento Informado" está em desacordo com a Res. CNS 196/96, item IV. Solicita-se ao CEP exigir a correção do documento antes da liberação para o início do estudo.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 21 de junho de 2006.

RECEBIDO POR FAX
Tania
ATA 22/06/06
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq - HCFMUSP

W. Saad Hossne
WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 3

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO : Nº : APTO:
- BAIRRO: CIDADE :
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº : APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Avaliação imunológica de pacientes portadoras de candidíase vulvovaginal
2. PESQUISADOR: Lana Maria de Aguiar
- CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
- UNIDADE DO HCFMUSP: ..Disciplina de Ginecologia HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
- RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa – As infecções vaginais por fungos causam corrimento e coceira, que são bastante desagradáveis. Algumas mulheres apresentam infecções recorrentes, ou seja, infecções repetidas que voltam a aparecer algum tempo após o tratamento. O sistema imune do organismo é responsável pela defesa contra infecções e atua em todos os locais do corpo, inclusive no aparelho genital. O objetivo desta pesquisa é avaliar se existem diferenças entre o sistema imune genital de mulheres que tem infecções repetidas por fungos e mulheres que não apresentam este tipo de infecção.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – A senhora fará um exame ginecológico normal e, durante este exame, será colhido com um cotonete de algodão material da vagina para pesquisa de fungos. A seguir, será colocado um pouquinho de líquido em sua vagina (soro fisiológico), que será aspirado com uma seringa (sem agulha) e enviado a um Laboratório nos Estados Unidos, na Universidade de Cornell, em Nova York, onde serão realizados alguns estudos para sabermos a quantidade de algumas substâncias que fazem parte do seu sistema imunológico. Estas substâncias chamam-se interleucinas e interferon. O nosso objetivo quando analisamos estes resultados é saber se há um desequilíbrio nestas substâncias presentes na secreção vaginal e se tem relação com o fato de algumas mulheres terem candidíase diversas vezes. Além disso, o mesmo Laboratório nos Estados Unidos irá realizar uma pesquisa para saber se existe alguma variação no gen que controla a produção da interleucina-1, que age no sistema imunológico. esse gen chama-se "gen codificador da interleucina. Para realizar este exame genético será necessário colher células do lado interno de sua bochecha com um cotonete de algodão. Também neste caso, os resultados de todos os exames das pacientes serão comparados com os resultados dos exames de mulheres que não tiveram candidíase várias vezes.

Os dados obtidos serão utilizados apenas para este estudo. Caso os exames confirmem a presença de fungos a senhora receberá tratamento adequado com medicamentos utilizados de rotina no Setor de Infecções do trato reprodutivo.

3. desconfortos e riscos esperados – O desconforto esperado é mínimo, a senhora já sabe que o exame ginecológico é desconfortável e este não é diferente, podendo ocorrer dor passageira apenas durante a colocação do espéculo, que é um instrumento que é introduzido na sua vagina para que o médico observe as paredes e o colo do útero. Todos os demais procedimentos são totalmente indolores e não causam risco para a sua saúde. O material colhido será utilizado somente para este estudo e qualquer outro procedimento somente poderá ser realizado com a sua autorização específica, mediante um novo Termo de Consentimento. A Sra. terá sua identidade e privacidade preservada durante e após a pesquisa. Apenas os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso ao seu prontuário médico.

4. benefícios que poderão ser obtidos – Com os resultados destes exames poderemos saber se a senhora possui alguma deficiência no sistema imune no trato genital, que facilite o aparecimento de infecções por fungos. As informações científicas obtidas poderão ser divulgadas em congressos e publicadas em revistas científicas, porém sem sua identificação

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo – Até o momento não existem outros benefícios na participação deste estudo. Entretanto, caso a deficiência do sistema de

defesa seja comprovada, poderão ser criados medicamentos que, além de matarem os fungos causadores da infecção, também estimulem as defesas naturais.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, estando a disposição o Pronto Socorro de Ginecologia e os pesquisadores, nos telefones 3069-6647 e 3082-7394.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Drª Lana Maria Aguiar e Iara Moreno Linhares 3069-7838

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 20 de outubro de 2005

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

PROJETO DE PESQUISA
AValiação imunológica de pacientes portadoras de
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

CONSENTIMENTO INFORMADO

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa sobre inflamação na vagina causada por fungos (os médicos chamam de “candidíase vaginal”). Gostaríamos de explicar a importância dessa pesquisa e os passos envolvidos na participação.

- 1- A inflamação da vagina causada por fungos provoca corrimento e coceira nos órgãos genitais. Algumas mulheres apresentam esse problema com frequência, ou seja, a inflamação volta a aparecer algum tempo depois de terminado o tratamento.
- 2- O sistema imune é responsável pelas defesas do organismo. Estudos feitos fora do Brasil mostraram que mulheres americanas que têm inflamações repetidas por fungos apresentam alguma alteração no sistema imune.
- 3- As características de cada pessoa são determinadas pelos gens. Isso inclui a maneira como cada organismo vai fazer as suas defesas. Entretanto, algumas vezes os genes podem apresentar pequenas modificações na sua estrutura, o que poderá prejudicar a ação do sistema imune.
- 4- O objetivo desta pesquisa é verificar se mulheres BRASILEIRAS que apresentam inflamações repetidas por fungos têm alguma alteração no sistema imune que facilite o aparecimento do problema (ou seja, como funciona a defesa do organismo dessas mulheres).
- 5- A participação na pesquisa envolve risco mínimo. Haverá um pequeno desconforto ao colocar-se um cotonete de algodão na parte de dentro da bochecha e esfregar de leve. Será também realizado o exame vaginal. Caso concorde em participar, a senhora responderá a algumas perguntas de seu médico, passará por um exame ginecológico onde será colhido material da vagina para verificar a presença de fungos. A seguir será colocado um pouquinho de líquido frio em sua vagina e aspirado para estudo do sistema imune. Este material será enviado para um laboratório especializado dos Estados Unidos. O último passo será a coleta de algumas células de sua boca, feita girando-se um cotonete de algodão algumas vezes contra a bochecha. Estas células da boca servirão para o estudo dos genes que determinam algumas das ações do sistema imune. Também este material será enviado para o mesmo laboratório dos Estados Unidos, sendo utilizado EXCLUSIVAMENTE para a realização desta pesquisa. Todos os procedimentos são rápidos e indolores. O material enviado ao laboratório ficará guardado por um período de 5 anos.
- 6- Caso os exames confirmem a presença de inflamação por fungos a senhora receberá o tratamento adequado.
- 7- A senhora será informada sobre os resultados dos exames realizados. Não existem outras vantagens na participação, porém a senhora estará contribuindo para o melhor conhecimento sobre o assunto, o que poderá ajudar na descoberta de

melhores tratamentos ou maneiras de prevenir a inflamação. Os resultados serão explicados para a senhora durante as consultas agendadas.

8- Todas as informações obtidas no estudo são CONFIDENCIAIS.

9- A sua decisão de participar ou não participar do estudo não alterará o atendimento que a senhora tem recebido neste hospital. Mesmo que prefira não participar, continuará a ser atendida da mesma maneira.

DECLARO QUE LI E ENTENDI O PRESENTE TERMO DE CONSENTIMENTO E ACEITO EM PARTICIPAR DA PEQUISA

Nome e assinatura da paciente

Nome e assinatura do investigador

Nome e assinatura de testemunha

Data

Telefones para contato Dra Lana Aguiar, Dra Iara Linhares: 3069-6000

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FMUSP**SERVIÇO DE INFECÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO (DST/AIDS)**favor fazer um círculo nos achados positivosProtocolos / data _____

Número ficha DST (A) Registro HC _____ Data _____

Nome _____

Endereço _____

Telefone _____

RAÇA - Branca - Negra - Amarela - Outra (_____)

ESTADO CIVIL - Solteira - Casada - Viúva - União Consensual

ESCOLARIDADE - Analfabeta - 1º Grau - 2º Grau - Superior - Pós-Graduação

PROFISSÃO _____

QUEIXA	Corrimento	Odor fétido	Queimação	Prurido	Dispareunia
	Disuria	Dor pélvica	Úlcera	Tumor	
	Outra (especificar) _____				

ANTECED PESSOAIS _____

_____ANTECEDENTES FAMILIARES _____

GESTAÇÕES _____ PARIDADE _____ (_____ partos normais _____ cesáreas)

ABORTOS: Espontâneos _____ Provocados _____ INFECÇÃO pós-parto / aborto

IDADE PRIMEIRO COITO _____ Nº PARCEIROS Últimos 6 meses _____
Total _____

FREQUÊNCIA MENSAL COITO Vaginal _____ Oral receptivo _____ Anal _____

HISTÓRIA VIOLÊNCIA SEXUAL _____ Idade _____

USO PRESERVATIVO	MASCULINO	sempre	ocasionalmente	nunca
	FEMININO	sempre	ocasionalmente	nunca

MÉTODO CONTRACEPTIVO _____

HISTÓRIA DE DST anterior Sim (_____) Não

Uso de drogas (_____) Parceiro (_____)

Alcoolismo - Duchas - Absorvente interno - Absorvente diário

Doenças autoimunes - Alergias - Doenças endócrinas
 Transfusão sangue / derivado
 Outros _____

CICLO MENSTRUAL Duração ____ dias Intervalo ____ dias UM ____/____/____
 Quantidade normal aumentada diminuída Dismenorreia

MEDICAÇÕES _____

EXAME FÍSICO Lesões pele / lesões mucosas hiperchrom. hipochrom. avermelh
 Localização _____
 Mamas _____
 Dor palpação hipogástrico _____
 Lesões genitais _____
 Dor contato com o vestíbulo _____
 Aspecto conteúdo vaginal fisiológico alterado _____
 Quantidade normal aumentada diminuída
 Odor fétido (whiff positivo) Medida pH vaginal _____
 Corrimento cervical _____
 Mácula rubra _____ Dor a mobilização colo
 Dor avaliação útero Dor avaliação anexos
 Espessamento ou massa anexial

OBSERVAÇÕES _____

MÉDICO _____

RESULTADO DE EXAMES

data _____

EXAME A FRESCO soro _____
 KOH _____

GRAM VAGINAL	Cels epitel.	ausentes	raras	moderadas	abundantes
	Leucócitos	a	r	m	a
	Doderlein	a	r	m	a
	Gram posit	a	r	m	a
	Gram neg	a	r	m	a
	Leveduras	presentes	ausentes		
	Clue cells	presentes	ausentes		
	Tricomonas	presentes	ausentes		
	Outros	_____			

GRAM CERVICAL Leucócitos ausentes raros moderados abundantes

OBSERVAÇÕES _____

8. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Propriedades gerais das respostas imunes. In: *Imunologia celular e molecular*. 3ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.4-11.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:27-53.

Babula O, Lazdāne G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose binding lectin, and a mannose binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis*. 2003;37:733-7.

Babula O, Lazdāne G, Kroica J, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Frequency of interleukin 4 (IL-4) 589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannose binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1258-62.

Boniotto M, Braidia L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med*. 2005;83: 308-15.

Bozzini N. Avaliação da flora vaginal no pré e pós operatório de mulheres submetidas à histerectomia total abdominal por doença benigna. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1993.

Burger D, Dayer JM. IL1-Ra. In: Oppenhermand JJ, Feldmann M. *Cytokine*. London: Academic Press; 2000. p 319-36.

Chaves JHB, Babayan A, Bezerra CM, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal Interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre term birth. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60:312-317.

Correa PR, David PRS, Peres NP, Cunha KC, Almeida MTG. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;3:177-81.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol*. 1991;45:187-218.

Dinarelli,CA. Biologic basis for interleukin-1 disease. *Blood*. 1996 ;87:2095-147.

DeSeta F, Maso G; Piccolo M, Bianchini E, Crovella S, de Santo D, Caterina P, Guaschino S. The role of mannose binding lectin gene polymorphisms in

women with recurrent bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(6):613e1-3.

Donders GGG, Prenen H, Venbeke G, Reybrouck R. Impaired tolerance for glucose in women with recurrent vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:989-93.

Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. *J Bras Doenças Sex Trans.* 1998;10:4-14.

Fan SR, Liao QP, Liu XP; Liu ZH, Zhang D. Vaginal allergic response in women with vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynecol Obstet.* 2008;101:27-30.

Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Reviews.* 1996;9:335-48.

Fidel PL, Ginsburg KA, Cutright JL, Wolf NA, Leaman D, Dunlap K, Sobel JD. Vaginal associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-Type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *Infect Dis.* 1997;176:728-39.

Fidel PL. History and newinsights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiology.* 2004;12(5):220-27.

Fidel PL. Immunity in vaginal candidiasis. *Cur Opin Infect Dis.* 2005;18:107-111.

Fidel PL. History and Update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57:2-12.

Fischer LD, Van Belle G. *Bioestatistics: a methodology for health sciences.* New York; John Wiley & Sons: 1993. 991p.

Forte WN. Sistema Complemento. In: *Imunologia Básica e Aplicada.* São Paulo: Artmed; 2000. p.41-51.

Forte WN. Citocinas. In: *Imunologia Básica e Aplicada.* São Paulo: Artmed; 2000. p.142-153.

Gadjeva M, Takashaki K, Thiel S. Mannose binding lectin-a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol.* 2004;41:113-21.

Giraldo PC, Von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares IM, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 2000;95: 413-6.

Giraldo PC, Babula O, Gonçalves AK, Linhares IM, Amaral RL, Ledger WJ, Witkin SS. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2007;109:1123-8.

Horovitz B. Mycotic vulvovaginites: a broad overview. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165 (Suppl 2):1188-92.

Huang YF, Wang W, Han JY, WX W, Zhang ST, Liu J, Hug G, Xiong P, Hamvas RM, Wood N, Gong FL, Bittles AH. Increased frequency of the mannose binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Euro J Immunogenet.* 2003;30:121-4.

Hurley R. Recurrent *Candida* infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1981;8:209-3.

Ip WK, Lau YL, Chan SY, Mok CC, Chan D, Tong KK, Lau CS. Mannose-binding lectin and arthritis in southern Chinese. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1679-87.

Janeway Jr CA, Travers P. Conceitos básicos em imunologia. In: Janeway Jr CA, Travers P. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.* 1997. p.1-56.

Jensenius JC, Jensen PH, McGuire K, Lassen JL, Thiel S. Recombinant mannan-binding lectin (MBL) for therapy. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:763-7.

Jeremias J, Ledger WJ, Witkin SS. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in women with vulvar vestibulitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 182:283-5.

Linhares IM, Siqueira LFG, Miranda SD, Reali C, Queiroz JA, Fonseca AM, Bagnoli VR. Vaginose bacteriana: experiência com o tianfenicol. *J Bras Ginecol.* 1995;105:405-9.

Linhares IM, Giraldo PC, Caetano ME, Nissan MD, Gonçalves AKS, Giraldo HPD. Candidíase vulvovaginal recorrente: fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. *Rev Cienc Med.* 2005;14:373-8.

Liu F, Liao Q, Liu Z. Mannose binding lectin and vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 92:43-7.

Lyczack JB. Innate Immunity In: *Immunology, infection, and immunity*. Pier GB, Lyczack JB, Wetzler LM. 2004, 29-46.

Mardh PA, Rodrigues AG, Genç M, Novikova N, Oliveira JM, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology clinical manifestations diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD & Aids.* 2002;13:522-39.

Mardh PA, Sziller I, Lolbert V, Novik N; Kristof K, Rodrigues AG, Vaz CP, Oliveira M. *Candida glabrata* with special reference to European epidemiology. Review and presentation of new data. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005;17;2:73-80.

Milanese M, Segat L, DeSeta F, Pirulli D, Fabris A, Morgutti M, Crovella S. MBL 2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59:146-51.

Neves, NA, Carvalho LP, De Oliveira MA, Giraldo PC, Bacelar O, Cruz AA, .Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:167-71.

Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:820-3.

Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Phys*. 2001;63:697-702.

Pellis V, De Seta F, Crovella S, Bossi F, Bulla R, Guashino S, Radillo O, Garred,P, Tedesco F. Mannose binding lectin and C3 act as recognition molecules for infectious agents in the vagina. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:120-6.

Pier,GB. Immunity. In: Pier GB, Lyczack JB, Wetzler LM. *Immunology, infection, and immunity*. ASM Press: Washington D.C., 2004. p.47-52.

Piccinni MP, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gomez MJ, Guedizi MG, Biagiotti R, Cassone A, Romagnani S, Maggi E. Type 1 T Helper cells specific for *Candida albicans* antigens in peripheral blood and vaginal mucosa of women with recurrent vaginal candidiasis. *Infect Dis*. 2002;186:87-93.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 15ed. Mosby International Ltd., 1998.

Roitt,I, Rabson A. Imunidade Inata. In: *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.1-9.

Sehouli J, Mustea A, Dominique K, Lichtenegger W. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biom Prev*. 2003;12:1205-1208.

Segat L, Silva VLR, Montenegro MF, Santos B, Arraes LC, Crovella S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene(MBL 2) in Brazilian patients with HIV infection. *Clin Immunol*. 2007;124:13-7.

Sobel JD. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;544:547-557.

Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis.

Clin Infect Dis. 1992;14(suppl 1):5148-53.

Sobel JD. Candidal vaginitis. *Clin Obstet Gynecol.* 1993;36:153-65.

Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;152:924-35.

Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369:1961-71.

Stewart DE, Wheilan CI, Fong IW, Tessler KM. Physicossocial aspects of chronic, clinically unconfirmed vulvovaginitis. *Obstet Gynecol.* 1990;76:852-6.

Swanson AF, Kuo CC. Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosilated. *Infect Immun.* 1991;59:2120-25.

Sziller I, Babula O, Ujházy A, Nagy B, Hupuczi P, Papp Z, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin S S. *Chlamydia trachomatis* infection, fallopian damage and a mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism. *Hum Reprod.* 2007;22:1861-65.

Tamandani DMK, Sobti RC, Shekari M, Kaur S., Huria A. Impact of polymorphism in IL1-ra gene on the risk of cervical câncer. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277:527-533.

Tosi MF. Innate immune responses to infection. *Allergy Clin Immunol.* 2005;116:241-9.

Weissenbacher T, Witkin SS, Ledger WJ, Tolbert V, Ginkel M, Scholz C, Weissenbacher ER, Friese K, Mylonas J. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detetion of Candida species by culture and polymerase chain reaction. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279:125-9.

Witkin SS. Transient local Immunosuppresion in recurrent vaginitis. *Immunol Today.* 1987a;8:360-3.

Witkin SS. Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immuno Microbiol.* 1987b;15:34-7.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA Recurrent vaginitis as a result of sexual transmission of IGE antibodies. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:32-6.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *candida albicans* in women with recurrent vaginitis. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:57-8.

Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M, Ledger WJ. Effect of *candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis.* 1991;164:396-9.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA. Localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J Allergy Immunol.* 1998;81:412-6.

Witkin SS, Giraldo PC, Linhares IM. New insights into the immune pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *It J Gynaecol Obstet.* 2000;3:114-8.

Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in disease. *Clin infect Dis.* 2002;34:204-9.

Witkin SS. Immunological mechanisms in the female genital tract In: Monif GR & Baker DA. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. New York: Pathernon Publishing Group; 2004. p.12.

Wu SF, Chang JS, Wan L, Tsai CH, Tsai FJ. Association of IL1-ra gene polymorphism, but no association of IL-1B and IL-4 gene polymorphism with Kawasaki Disease. *J Clin Lab Anal.* 2005;19:99-102.

DEDICATÓRIA

*Á minha filha Mariana, pelo carinho, compreensão,
companheirismo e constante incentivo.*

Razão do meu viver, a luz da minha vida...

*À minha mãe Tomico, pelo dom da vida, por seu amor
incondicional e doação plena.*

Saudades...

*Aos meus pais do coração, Danilo e Alzira, por me amarem e
acreditarem no meu sonho e por estarem sempre presentes em
todos os momentos da minha vida.*

Minha eterna gratidão e amor...

À Deus

Caminho, Verdade e Vida.

Pai Eterno, fonte de força e esperança.

Essência da minha vida e formação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Paulo e Danilo pelo amor, carinho, amizade e por serem sempre presentes em minha vida e na de Mariana.

Ao meu cunhado-irmão Silvio Antônio pelo constante suporte em todas as fases desta tese, pelos preciosos ensinamentos, companheirismo e transmissão do seu amor à vida acadêmica.

À minha irmã Inês por seu amor incondicional, seu incentivo, por sempre acreditar em meus sonhos e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sobrinhos Silvio Augusto e Lucas, minhas paixões e orgulho.

*Aos meus tios Dario, Sebastião e Maria Gabriela pelos seus
conselhos e apoio.*

Às minhas primas Gabriela e Isabel, pelo companheirismo e carinho.

*Minha gratidão por partilharem dos momentos importantes da
minha vida.*

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat pela oportunidade a mim concedida de desenvolver este trabalho e estímulo à todos os pós-graduandos.

À Dra. Iara Moreno Linhares pela dedicada orientação, amizade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Steven Witkin pela inestimável colaboração, atenção e paciência sempre dispensadas.

À Dra. Lana Maria de Aguiar pelo estímulo constante ao meu crescimento interior e profissional, carinho, apoio e amizade.

Aos Dr. Oswaldo Okusu, Dr. Miguel Bartolomé Veras e Dra. Arlete Gianfaldoni, pela amizade e incentivo.

À amiga Dra. Maria Eugênia Caetano pela amizade sincera, apoio no primeiro passo para meu aprimoramento profissional.

Ao Dr. Paulo Sérgio Pereira da Conceição pelo companheirismo, conselhos e amizade.

Às amigas, quase irmãs Ludmila Miliauskas Fernandes, Mônica de Almeida Gonçalves, Cássia Regina Dumitrescu Dias, Gisele Assumpção e Ana Paula Selli Cocci, por sempre me incentivarem e me acolherem nos momentos difíceis e comemorarem comigo as minhas conquistas.

Às Dras. Maria Aparecida Basile e Elia Miranda pelo constante incentivo e carinho.

À Dra. Anne Marie Bongiovani pelo apoio e colaboração.

Às funcionárias:

Srta. Cláudia Vieira

Srta. Mara Núbia Caetano de Almeida

Sra. Edilene Bento da Silva

Sra. Valéria Vilhena

Sra. Marinalva Souza Aragão

Sra. Márcia Arruda

Ao Sr. Rogério Ruscito

Sra. Cristiane Strega

Às pacientes que permitiram que todas as informações e exames se transformassem nesta tese

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Candidíase vulvovaginal.....	01
1.2- Imunologia na candidíase vulvovaginal	05
1.3- Polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina 1(IL1-Ra)	11
2. PROPOSIÇÃO.....	16
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	17
3.1- Desenho do estudo	17
3.2- Tamanho amostral.....	17
3.3- Casuística.....	17
3.4- Método.....	19
3.4.1- Método de estudo	19
3.4.2- Descrição da leitura.....	20
3.4.3- Definição das variáveis	21
3.5- Método estatístico	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	50
7. ANEXOS.....	51
8. REFERÊNCIAS	61

Lista de abreviaturas

aC	antes da era cristã
ACI	anticoncepcional injetável
ACO	anticoncepcional oral
<i>Candida sp.</i>	candida espécies
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CVVR	candidíase vulvovaginal recorrente
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DST	doenças sexualmente transmissíveis
et al	e colaboradores
°C	graus centígrados
HPV	<i>Human papilloma virus</i>
ICM	imunidade celular mediada
IL-1	interleucina 1
IL-1Ra	antagonista do receptor da interleucina-1
IL-2	interleucina 2
LTB	laqueadura tubária bilateral
MAC	método contraceptivo
MBL	<i>mannose binding lectin</i>
mg	miligramas
ml	mililitros

mol/l	mol por litro
N	amostra
p	p valor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
pH	potencial de hidrogênio
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	rotações por minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH1	<i>T helper 1</i>
TH2	<i>T helper 2</i>

Lista de tabelas

Tabela 1.	Características gerais e antecedentes de DST de mulheres com e sem CVVR	24
Tabela 2.	Escolaridade referida pelas mulheres com e sem CVVR	25
Tabela 3.	Antecedentes obstétricos das mulheres com e sem CVVR	26
Tabela 4.	Distribuição dos diferentes métodos anticoncepcionais adotados pelas mulheres com e sem CVVR	27
Tabela 5.	Sintomas referidos pelas pacientes com CVVR	28
Tabela 6.	Achados do exame ginecológico em pacientes com CVVR	29
Tabela 7.	Tipo de flora vaginal segundo a bacterioscopia pelo método de Gram nas pacientes com e sem CVVR	30
Tabela 8.	Resultado da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou.....	31
Tabela 9.	Número de parceiros sexuais nos últimos seis meses referidos pelas pacientes com e sem CVVR	32
Tabela 10.	Polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL em mulheres com e sem CVVR	33

Tabela 11.	Polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra em mulheres com e sem CVVR	34
Tabela 12.	Polimorfismo dos genes que codificam a MBL e o IL-Ra em mulheres com e sem CVVR	35
Tabela 13.	Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR	36
Tabela 14.	Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR	38

RESUMO

Wojitani MDCH. *Avaliação da frequência do polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1-Ra) em mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 72p.

A candidíase vulvovaginal corresponde a uma das mais frequentes infecções do trato reprodutivo. Estima-se que 75% das mulheres na idade reprodutiva experimentarão pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante suas vidas, a maioria evoluirá com episódios infrequentes, entretanto, 5% sofrerão recorrência, ou seja, quatro ou mais episódios de candidíase vulvovaginal comprovadas clínica e laboratorialmente no período de 1 ano. Os mecanismos pelos quais as recorrências ocorrem ainda são pouco conhecidos, estando provavelmente relacionados à alterações na imunidade local. O presente estudo teve como objetivo avaliar as associações entre os polimorfismos nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e do antagonista do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra) com a candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) em mulheres brasileiras. Foram estudadas 100 mulheres portadoras de CVVR atendidas no Serviço de Imunologia Genética e Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para a análise dos polimorfismos nos genes que codificam para a MBL e o IL1-Ra realizou-se coleta de células bucais que foram enviadas para *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University*. Resultados: Mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente apresentaram maior frequência de polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL quando comparadas a mulheres saudáveis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência do polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra entre os grupos estudados.

Descritores: candidíase vulvovaginal recorrente, polimorfismo genético, lecitina de ligação de manose, proteína antagonista do receptor de Interleucina-1.

SUMMARY

Wojitani MDCH. *Frequency of polymorphisms in the genes coding for mannose binding ligation (MBL) and Interleukin-1 receptor antagonist (IL1-Ra) in women with recurrent vulvovaginal candidiasis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 72p.

Vulvovaginal candidiasis is the most common genital infection in women during their childbearing years. About 75% of women suffer at least one symptomatic episode during their lives. Most of them will have infrequent episodes, but 5% will suffer recurrent episode of vulvovaginal candidiasis. The mechanisms responsible for recurrent vulvovaginal candidiasis (RVCC) remain a matter of speculation, although an alteration in local immunity appears to be a major factor. The aim of this study was to assess the correlation between polymorphisms in the genes coding for mannose-binding lectin (MBL) and interleukin-1 receptor antagonist (IL1-Ra) and RVCC in women from São Paulo, Brazil. The study population consisted of 100 women with RVCC, who were seen at Serviço de Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. To analyse for the MBL codon 54 gene polymorphism and for IL1-Ra, buccal cells were obtained with a cotton swabs and shipped to New York at ambient temperature. The polymorphisms were identified in the *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University*. Results: Women with RVCC present a high frequency of polymorphisms at codon 54 in the gene coding for MBL; on the other hand there were no differences in polymorphism frequency in the gene coding for IL1-Ra when compared to control women.

Descriptors: candidiasis vulvovaginal recurrent, polymorphism genetic, mannose binding lectin, interleukin 1 receptor antagonist protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal corresponde a uma das mais frequentes infecções do trato reprodutivo. A *Candida albicans*, organismo comensal dimórfico dos tratos genital e gastro-intestinal é o agente etiológico em cerca de 85 a 90% das pacientes com cultura vaginal positiva para fungos. O restante dos casos é devido a espécies não *albicans*, sendo a maioria representada pela *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (Fidel & Sobel, 1996; Weissenbacher et al, 2009; Correa et al, 2009).

A *Candida sp.* é classificada como fungo Gram-positivo, dimórfico, saprófita, que tem limitada virulência (Sobel, 1998). Pode apresentar-se sob a forma de esporos e hifas que, ao se agruparem, formam os micélios, responsáveis pela manifestação clínica da candidíase (Horovitz, 1991).

Os fungos ocorrem na natureza como saprófitas de seres humanos e animais. Quando existe um desequilíbrio no ecossistema em que se encontra, o fungo pode se tornar maléfico, invasivo e causar doenças (Witkin et al, 2000).

Os fungos possuem um corpo vegetativo chamado de talo ou soma que é composto de finos filamentos unicelulares chamados de hifas. Estas hifas geralmente formam um aglomerado chamado de micélio por onde o alimento é absorvido; encontrado geralmente onde há parasitismo podendo causar danos ao epitélio humano (Cutler, 1991).

A *Candida sp* como agente causal de vulvovaginite foi descrita pela primeira vez em 1849 por Wilkinson. Em 1986, Kurtz et al desenvolveram um sistema de identificação do DNA que permitiu o estudo genético de diferentes tipos de *Candida*. A *Candida sp* é um fungo que se reproduz por brotamento e assume a forma tubular ou de hifa. Na classificação filogenética, pertence à classe dos *Ascomycetes*, subclasse *Hemiascomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Cryptococcaceae*. É considerada saprófita, porém oportunista, aproveitando-se do estado imunológico débil do hospedeiro para atuar como agente agressor, levando ao quadro eventual de candidíase (Sobel et al, 1992).

Estima-se que aproximadamente 75% de todas as mulheres na idade reprodutiva experimentarão pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante suas vidas (Milanesse et al, 2008; Fan et al, 2008; Weissenbacher et al, 2009; Correa et al, 2009). A maioria destas mulheres evoluirá com episódios infrequentes, muitos dos quais precipitados por fatores como gravidez, uso de antimicrobianos, uso de contraceptivos hormonais, estado de imunossupressão, *diabetes mellitus*, hábitos inadequados de higiene e vestuário, deficiência de ferro e de zinco (Fidel & Sobel, 1996; Duarte & Landers, 1998; Linhares et al, 2005; Weissenbacher et al, 2009). Entretanto, 5% das mulheres com candidíase vulvovaginal sofrerão de episódios recorrentes, apesar de responderem à terapêutica antifúngica adequada durante a fase aguda da doença e de evitarem, ou mesmo não apresentarem, os fatores predisponentes para o desenvolvimento de um novo surto de candidíase (Hurley, 1981; Sobel,

1988; Fidel & Sobel, 1996; Fidel et al, 1997; Witkin et al, 2000; Mardh et al, 2002).

Os gastos com diagnósticos e tratamentos da candidíase vulvovaginal nos Estados Unidos da América ultrapassam 1 bilhão de dólares por ano, onde esta moléstia é a segunda infecção vaginal mais comum depois da vaginose bacteriana. O número de prescrições de fármacos para tratamento fúngico dobrou entre 1980 e 1990, chegando a 13 milhões de prescrições (Sobel et al, 2007).

A candidíase é rara antes da menarca e apresenta um pico de recorrência nas terceira e quarta décadas da vida, sendo mais comum na fase lútea do ciclo menstrual. Após a menarca, com o aumento dos níveis hormonais e por possíveis deficiências nos mecanismos de defesa vaginal, a candidíase pode tornar-se mais frequente.

Define-se candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) como o aparecimento de quatro ou mais episódios em um ano, com evidências clínicas e laboratoriais de infecção por *Candida sp.* (Mardh et al, 2002).

Entretanto, os fatores que influenciam a susceptibilidade às recorrências ainda permanecem indefinidos, embora os estudos já tenham avançado em direção à alterações na genética como fator predisponente. Assim, há interesse e motivação para novos estudos e pesquisas (Sobel, 1995; Giraldo et al, 2000; Witkin et al, 2000; Mardh et al, 2002; Fidel, 2007).

Algumas mulheres podem ser diagnosticadas precipitadamente como candidíase recorrente. Reações de hipersensibilidade ou reações alérgicas às terapêuticas antimicóticas podem também resultar na manutenção dos

sintomas e atribuídos à presença de fungos. Esses processos podem resultar em elevação dos níveis de prostaglandina E2, com consequente inibição da imunidade mediada por células (Witkin et al, 1989; Neves et al, 2005). Em um estudo, *Candida sp.* foi identificada por cultura vaginal apenas em 28% de 554 mulheres com sintomas da candidíase vulvovaginal (Witkin et al, 2000).

É importante, portanto, para se obter uma resposta terapêutica satisfatória, fazer um diagnóstico correto. Deve-se diferenciar o termo “crônico” e “recorrente”, os quais muitas vezes são interpretados erroneamente. Uma infecção crônica é ativa, persistente por um longo período. Já a recorrência é aquela onde o processo infeccioso termina, permanecendo ausente por um período curto, mas que retorna sintomático. Assim é a candidíase recorrente (Witkin et al, 1991).

A candidíase vulvovaginal recorrente tem importância, não só pela repercussão no aspecto financeiro, mas nas mudanças diárias marcantes da mulher, na alteração de humor (pelo incômodo do quadro com queimação, dor, ardor, edema local, disúria de variada intensidade) (Mardh et al, 2005), distúrbios sexuais (dispareunia, diminuição da libido, desconforto) (Stewart et al, 1990) e no âmbito afetivo (auto-estima) (Correa et al, 2009).

Ressalta-se também a diferença entre infecção e colonização. Muitas mulheres assintomáticas são continuamente colonizadas por *Candida albicans* em suas vaginas, mas isso é diferente de uma infecção latente ou crônica. O que transforma uma colonização comensal em infecção é ignorado. Essas pacientes apresentam anticorpos contra a *Candida*, porém,

infelizmente esses anticorpos não previnem o desenvolvimento da infecção vaginal sintomática (Sobel, 1993; Witkin et al, 2000).

1.2. Imunologia na candidíase vulvovaginal

O termo imunidade é derivado da palavra em latim *immunitas* que se referia aos deveres dos senadores romanos (Abbas et al, 2000). Cita-se que Thucydides, em Atenas, durante o século quinto aC foi o pioneiro a relacionar a imunidade às “pestes”. O conceito, portanto, de imunidade tem suas raízes na antiguidade e mantém seus segredos na ciência até hoje, chamando a atenção de muitos pesquisadores.

A resposta imune é a forma mais efetiva para evitar que a infecção se estabeleça, sendo representada pela defesa do organismo frente a qualquer fator agressor para proteção do mesmo. Constitui-se na soma de todos os mecanismos de defesa que protegem o indivíduo contra as doenças infecciosas (Tosi, 2005).

Há dois tipos de imunidade: natural ou inata e a adquirida ou adaptativa.

A imunidade inata é considerada não específica, significando que seus fatores constituintes estão sempre presentes no organismo, alertas para defesa o tempo todo em níveis basais (Pier, 2004). São eles:

- barreiras anatômicas representadas pela pele, membranas mucosas e muco;
- mecanismos de eliminação, como a fagocitose;

- variáveis fisiológicas como o pH, temperatura, proteínas ligadoras de ferro;

- proteínas enzimáticas como o sistema complemento e lisozimas;

- defesas químicas como o óxido nítrico e íon superóxido;

- peptídeos antimicrobianos representados pelas defensinas, lecitina ligadora de manose (MBL) e outros.

A resposta imune inata é rápida, representa o combate inicial à infecção (Pellis et al, 2005) e alerta a imunidade adquirida para iniciar uma resposta específica dirigida ao agente agressor, através da formação de anticorpos ou da resposta celular (Witkin, 2004).

A imunidade adquirida, como o próprio nome diz, é adaptada ao encontrar determinado patógeno específico. De maneira diferente da imunidade natural, necessita de várias horas para se desenvolver. Assim, somente quando as defesas inatas forem ultrapassadas ou sobrepujadas, o hospedeiro passa a necessitar de uma resposta imune induzida ou adaptativa, envolvendo a ativação de uma variedade de mecanismos humorais ou celulares:

- imunidade humoral: produção de anticorpos e citocinas;

- imunidade celular, mediada por células, com ativação de linfócitos T (Janeway & Travers, 1997; Roitt & Rabson, 2003).

O sistema imune tem três principais características:

A primeira é a especificidade, ou seja, a habilidade de reconhecer e distinguir cada molécula com suas características individuais.

A segunda é a de discriminar entre elementos próprios e elementos estranhos ao organismo, ou seja, há uma coexistência pacífica com inúmeras proteínas do próprio hospedeiro e com as outras estranhas a ele.

A terceira função é a capacidade de memória, sendo capaz de reconhecer uma substância anteriormente estranha e prevenir infecções pelo mesmo agente.

Assim, cada etapa da resposta imune é uma sequência de complexos eventos, envolvendo várias células, cada qual com sua função (Janeway & Travers, 1997; Roitt & Rabson, 2003).

Os leucócitos derivam de precursores na medula óssea. Dão origem aos leucócitos polimorfonucleares e aos macrófagos do sistema imune inato e aos linfócitos do sistema imune adaptativo ou adquirido.

Existem dois tipos principais de linfócitos: os linfócitos B que amadurecem na medula óssea, e os linfócitos T que amadurecem no timo. A medula óssea e o timo são, pois, conhecidos como órgãos linfóides centrais. Uma vez amadurecidos, os macrófagos e os mastócitos migram para os tecidos do corpo, mas todas as outras células do sistema imunológico circulam no sangue.

Os linfócitos recirculam, continuamente do sangue para os órgãos linfóides periféricos, onde o antígeno é capturado, retornando ao sangue através dos vasos linfáticos. Os três principais tipos de tecido linfóide periférico são o baço, que coleta antígenos do sangue, os linfonodos que apanham o antígeno dos sítios de infecção nos tecidos, e o tecido linfóide associado ao intestino, que recolhe antígenos do intestino. As respostas

imunes adquirida são iniciadas nos tecidos linfóides periféricos (Roitt & Rabson, 2003).

Os patógenos que ultrapassam essa barreira se confrontam com duas linhas de defesa imediatas. Primeiro, elas se expõem ao ataque humoral pela via de ativação alternativa do sistema complemento, que está espontaneamente ativo no plasma e pode opsonizar ou destruir patógenos, poupando as células hospedeiras, que estão protegidas pelas proteínas reguladoras do complemento. Em segundo lugar, elas podem ser englobadas pelos macrófagos, dotados de receptores para os componentes agressores: bactérias, vírus e fungos (Lyczack, 2004).

Os principais responsáveis pela ativação da resposta da imunidade celular mediada (ICM) são os linfócitos T e a resposta humoral será determinada pelos linfócitos B. Há duas vias de ativação dos linfócitos T:

A resposta humoral é determinada pela ativação de linfócitos B e caracterizada pela formação de anticorpos, enquanto que a imunidade celular é caracterizada pela ativação dos linfócitos T. A ativação dos linfócitos T pode acontecer por duas vias. A primeira, pelas células T inflamatórias (TH1), que ativam macrófagos infectados para a destruição de patógenos intracelulares e resulta na liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), que ativarão a resposta mediada por células ; a segunda por células T auxiliares (TH2), que estimulam a produção de anticorpos (Janeway & Travers, 1997; Giraldo et al, 2000).

Mecanismos da ICM são os principais a limitar a proliferação vaginal da *Candida sp.* no hospedeiro (Fidel, 2004). Células linfóides

mononucleares, macrófagos e linfócitos parecem ser os maiores reguladores do crescimento fúngico na vagina e a CVVR parece representar uma infecção oportunista secundária a um defeito transitório da imunidade mediada (Witkin et al, 1991). As mulheres com algum defeito na ICM têm alta prevalência de vaginite por *Candida sp.* (Witkin, 1987a).

A candidíase vulvovaginal também pode se estabelecer através de uma resposta de hipersensibilidade local (Roitt & Brostoff, 1998; Giraldo et al, 2000). Esta resposta inadequada poderia bloquear a imunidade celular mediada e levar à proliferação fúngica, instalando-se o quadro de candidíase. Interessante citar a possibilidade de alguns componentes presentes no sêmen do parceiro reagirem como substâncias alérgicas (presentes nos espermicidas ou materiais lubrificantes), que, ao entrarem em contato com a mucosa vaginal, iniciem um processo alérgico e sensibilizem a mulher (Witkin et al, 1988; Witkin et al, 1998; Giraldo et al, 2000).

Importantes elementos do sistema imune são as citocinas (Forte, 2000). Citocinas são sinalizadores protéicos que atuam como mediadores da comunicação intercelular, regulando a resposta imunológica por meio da maturação, da proliferação, da diferenciação e da ativação ou inibição de diferentes células do sistema imune, aumentando ou diminuindo a resposta imune (Piccini et al, 2002; Roitt & Rabson, 2003; Forte, 2000; Fan et al, 2008).

As citocinas são classificadas segundo o tipo de ação que desenvolvem em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Entre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se a IL-1 e seu antagonista, o inibidor do receptor de IL-1 (IL1-Ra) (Arend et al, 1998; Witkin et al, 2002). As principais células produtoras de IL-1 alfa são os queratócitos, as de IL-1 beta são os monócitos e macrófagos e as de IL-1 gama, as células infectadas por vírus. Células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T também podem sintetizar IL-1. As formas IL-1 alfa e beta têm os mesmos receptores, resultando assim, em atividades semelhantes. As frações alfa e beta, por sua vez, constituem a maior parte de IL-1, sendo alfa a fração principal. A IL-1 é considerada um pirógeno endógeno, capaz de aumentar as defesas gerais pela elevação da temperatura do corpo (Roitt & Rabson, 2003). Pode iniciar uma cascata de eventos para recrutamento e ativação de macrófagos e neutrófilos, vasodilatação e febre, assim como uma resposta pró-inflamatória potente. O papel principal do sistema que envolve a IL-1 é a proteção contra qualquer injúria, desde um simples processo inflamatório até o câncer (Witkin et al, 2002).

As atividades biológicas primordiais de IL-1 alfa e beta incluem ainda a hematopoiese, com atuação na própria célula primordial, aumentando a liberação de fatores estimuladores de crescimento de colônias, com ação sinérgica a tais fatores. Além disso, atua como estimulante de células CD4 a secretarem IL-2 com proliferação de linfócitos B levando a aumento da síntese de imunoglobulina e aumentando a capacidade citotóxica dessas células. Também induz a síntese de proteínas de fase aguda da inflamação por hepatócitos.

De maneira geral a IL-1 tem sua ação regulada pela ação do antagonista de seu receptor, IL1-Ra, o qual foi o primeiro antagonista de interleucina a ser descrito. A ação inibitória do antagonista do receptor da interleucina -1 foi inicialmente descrita em cultura de monócitos de urina de paciente em pico de febre durante processo infeccioso (Arend et al, 1998).

A IL-1 Ra pertence à família da IL-1, o qual agrega-se ao receptor desta interleucina, mas sem induzir resposta intracelular. É produzida pelas células hepáticas como uma proteína de fase aguda (Arend et al, 1998). Sua presença na circulação sanguínea é baixa em situações normais, ou seja, basais, porém é elevada em indivíduos que apresentam doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes (Burger & Dayer, 2000). Acredita-se, então que sua produção é estimulada na presença de alterações inflamatórias persistentes (Arend et al, 1998).

1.3. Polimorfismo nos genes que codificam a lecitina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra)

Toda essa expressão imune, incluindo a secreção de citocinas, depende de constituintes genéticos predeterminados no material hereditário de cada indivíduo.

O gene é a unidade fundamental da hereditariedade. Cada gene é formado por uma sequência específica de ácidos nucleicos DNA ou RNA, ou seja, o gene é um segmento de um cromossomo, a qual corresponde um código distinto, uma informação para produzir uma determinada proteína.

O DNA é uma estrutura linear em dupla hélice, composta de duas cadeias intercaladas de materiais estruturais chamados de nucleotídeos. Cada nucleotídeo consiste em um grupamento fosfato, um açúcar desoxirribose e uma das quatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina e timina. Ao estudar as sequências de DNA do genoma humano, verificou-se que muitos genes eram polimórficos. O termo polimorfismo vem do grego *poly*, significando muitos e *morpho*, significando forma ou estrutura, ou seja, há variação num único loco ou lugar genético. Assim, uma simples troca ou repetição de uma base nitrogenada de um nucleotídeo pode modificar a expressão da proteína codificada pelo gen; tal alteração pode desencadear severas desordens patológicas (Witkin et al, 2002).

Em um gene eucariótico há uma região reguladora no qual várias proteínas se ligam, fazendo com que ocorra a transcrição no momento oportuno. Às vezes a sequência codificante de proteína é interrompida por segmentos chamados de íntrons, cujas funções ainda são discutíveis. As sequências intercaladas pelos íntrons são chamadas de éxons, ou seja, entre dois éxons existe um íntron na sequência. A maior parte dos genes polimórficos codifica proteínas que variam em apenas um ou em poucos aminoácidos, mas que diferem em sobremaneira em suas funções, facilitando recorrência de algumas doenças.

Um gene polimórfico que vem recebendo especial atenção é o gene que codifica o antagonista do receptor da IL-1. Este gene está locado no cromossomo 2 próximo aos genes codificantes para IL-1alfa e IL-1 beta, os

quais são os principais indutores de respostas imunes pró-inflamatórias (Dinarello, 1996.)

Polimorfismos no gene que codifica o IL1-Ra foram descritos sendo associados a algumas doenças como colite ulcerativas, *alopecia areata*, lesões cutâneas em lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves e manifestações de neuropatia periférica por diabetes *mellitus* (Arend et al, 1998), doença de Kawasaki (Wu et al, 2005), parto prematuro (Chaves et al, 2008) e na carcinogênese de diferentes tumores sólidos malignos como o câncer de ovário (Sehouli et al, 2003) e câncer cervical (Tamandani et al, 2008). Os mecanismos, porém, pelos quais isso acontece ainda são obscuros.

Recentemente houve grande interesse no estudo de outra proteína constituinte do sistema imune natural ou inato, a lectina ligadora de manose (*mannose-binding lectin*, MBL). Tal proteína é secretada pelo fígado e possui a habilidade de agregar-se a várias estruturas de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. Tem papel importante na imunidade inata e possivelmente existe uma relação na sua deficiência e aparecimento de algumas doenças (Liu et al, 2006; Babula et al, 2003; DeSeta et al, 2007; Donders et al, 2002).

A MBL é encontrada no soro normal em níveis baixos, mas também é produzida em quantidades aumentadas durante a resposta de fase aguda. Como citado anteriormente, é ligadora de açúcar ou lectina, membro de uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, conhecidas como colectinas.

A MBL foi isolada pela primeira vez em soro de coelhas em 1970. Foi também isolada na vagina e parece reconhecer resíduos de N-acetilglucosamina, um açúcar presente na superfície de microrganismos (Gadjeva et al, 2004). Assim, também pode ativar o sistema complemento contra infecção fúngica, o que lhe confere papel protetor (Babula et al, 2003; Babula et al, 2005; Liu et al, 2006; Milanese et al, 2008).

O gene codificante para a MBL é polimórfico, ou seja, apresenta-se em diferentes formas. Isso resulta na diminuição da síntese da proteína e também na produção de uma proteína instável. Portanto, em presença do polimorfismo, ocorrem concentrações mais baixas na circulação e na vagina, além de prejuízo na atividade devido à instabilidade da proteína (Milanese et al, 2008).

O gene codificante para a lecitina ligadora de manose apresenta três polimorfismos funcionais no *exon* 1 (Segat et al, 2007). O polimorfismo no códon 54 é o mais comum entre a população da raça branca. O polimorfismo no códon 57 está presente com maior frequência na raça negra enquanto que o polimorfismo no códon 52 é menos frequente em aproximadamente 5% em ambas as populações (Babula et al, 2003; Giraldo et al, 2007).

O decréscimo da lecitina ligadora de manose circulante parece estar relacionada ao aumento de várias doenças sistêmicas como o lúpus eritematoso (Huang et al, 2003), colite ulcerativa, artrite reumatóide (Ip et al, 2000), doença celíaca, Síndrome de Sjögren e doenças infecciosas, como aumento na frequência de candidíase em determinadas mulheres (Boniotto et al, 2005).

Estudo recente demonstrou que a deficiência da proteína MBL devido ao polimorfismo no códon 54 levou a um aumento significativo de recorrência de vulvovaginite fúngica em mulheres na Latvia e em mulheres chinesas, demonstrando a importância da MBL como fator protetor vaginal (Babula et al, 2003; Liu et al, 2006). A preocupação com as consequências físicas e emocionais da candidíase vulvovaginal recidivante nas mulheres e a pesquisa de tratamentos mais adequados para esta afecção têm motivado os investigadores na busca de novos elementos relacionados à sua fisiopatologia. Diversos estudos têm demonstrado a importância do sistema imune no aparecimento e no controle das recorrências. Assim, no presente estudo procurou-se avaliar as correlações entre os polimorfismos nos genes que codificam a lectina ligadora de manose (MBL) e o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1- Ra), respectivamente, e a presença de candidíase vulvovaginal recidivante em mulheres brasileiras.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar a frequência do polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose (MBL) e no gene que codifica o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1 Ra), respectivamente, em mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente, comparadas a mulheres saudáveis.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo tipo caso-controle.

3.2. TAMANHO AMOSTRAL

Baseado na prevalência do genótipo selvagem do polimorfismo no códon 54 (MBL) em mulheres saudáveis de 84% e intervalo de confiança de 95% e poder de 80%, espera-se encontrar um percentual máximo de genótipo selvagem em mulheres com candidíase recidivante de 62%. Tendo essa diferença como interesse, o número necessário de mulheres em cada grupo para realização do presente estudo é de 60. O cálculo da amostra segue metodologia descrita em Fischer & Van Belle, 1993.

3.3. CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp (anexo 1) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (anexo 2).

Foram estudadas 100 mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recidivante atendidas no Setor de Imunologia, Genética e Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo A - estudo). Todas as

pacientes apresentavam história de candidíase vaginal recidivante caracterizada por, pelo menos, quatro episódios de candidíase vulvovaginal comprovados clínica e laboratorialmente no período de 1 ano.

Como grupo controle (grupo B) foram estudadas 100 mulheres atendidas no mesmo setor ou em outros setores da Disciplina de Ginecologia que não apresentavam história de candidíase vulvovaginal recidivante.

Os dois grupos (A e B) foram constituídos por mulheres com características epidemiológicas semelhantes

Adotou-se os seguintes critérios de inclusão:

- Vida sexual ativa;
- Menacme.

Como critérios de exclusão foram considerados:

- Uso de antimicrobiano nos 30 dias que precederam a coleta do material;
- Uso de dispositivo intra-uterino;
- Gestação;
- Diabetes *mellitus*;
- Presença de neoplasias malignas;
- Soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana;
- Doenças auto-imunes;
- Uso de anticoncepcionais orais combinados cuja dose de etinilestradiol fosse maior ou igual a 0,03mg e a de progestogênio maior ou igual a 0,15 mg.

3.4. MÉTODO

3.4.1. Método de estudo

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido- TCLE (anexo 3), as pacientes foram submetidas a anamnese e exames físico e ginecológico, onde foi coletada a citologia oncótica cervicovaginal.

A seguir foi solicitada a coleta de exames microbiológicos, constando de cultura para fungos em meio específico (Saburroaud) e realização de esfregaço para bacterioscopia com coloração pelo método de Gram. Solicitou-se ainda pesquisa por PCR para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Os exames foram coletados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A seguir, realizou-se a coleta de células bucais para a obtenção do material para análise genética. Tais células foram colhidas por meio de um swab de algodão (*Foam-tip buccal cell collection swab-catch ALL TM Sample Collection Swab Epicentre Madison W153713 USA*), que gentilmente foi pressionado e rodado na parte interna das bochechas.

Este material foi mantido a -20° e após foi enviado a *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University* para análise do polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose e o polimorfismo no gen que codifica o antagonista do receptor da interleucina 1(IL1-Ra), no ítron 2.

3.4.2. Descrição da leitura

O DNA foi extraído de células da mucosa coletadas através de *swabs* bucais, conforme descrito anteriormente. As amostras foram descongeladas e microcentrifugadas por 8 minutos, a 12.000 rpm (o concentrado é o foco para análise do DNA).

O sobrenadante foi lavado por 3 vezes com 250-400 ml de PBS; preparado os tubos foram preparados e numerados. Adicionou-se 1 gota de óleo mineral a cada tubo, seguido de 10 ml de proteinase K (PK) aos mesmos tubos. As células foram lisadas por incubação a 56°C por 60 minutos e a proteinase K foi então inativada, aumentando-se a temperatura para 96 °C por 10 minutos.

Os reagentes para a reação de PCR estavam guardados a -70 °C no freezer; para o descongelamento foram colocados à temperatura ambiente por 20 minutos.

Adicionou-se às amostras 10mmol/l Tris- ácido hidroclicorico que continha 1.5 mmol/l MgCl₂;50mmol/l KCl;0.2 mmol/l de: trifosfato deoxiadenosina, trifosfato deoxytidina, trifosfato deoxyguanosina, trifosfato timidina;1.25 unidades de Taq polimerase e 30 pmol de *primers* específicos (que amplificam a região em questão). As amostras foram incubadas em ciclo térmico.

Primers oligonucleotídeos para o gene do MBL:

5`AGA ATT CGT AGG ACA GAG GGC ATG CTC-3`

Primers oligonucleotídeos para o gene do IL1-Ra:

5`CTC AGC AGC AAC ACT CCT ATT-3`

Os produtos da reação de PCR foram lidos através de eletroforese em gel agarose a 3% marcados com etil bromídeo.

3.4.3. Definição de variáveis

- **Idade:** número de anos completos na data do exame;
- **Etnia:** branca, negra, amarela e parda;
- **Escolaridade:** fundamental, médio, superior e pós- graduação;
- **Idade da primeira relação sexual;**
- **Paridade:** número de partos vaginais ou de cesárias com gestações superiores a 20 semanas;
- **Número de abortos:** número de perdas gestacionais com 20 semanas ou menos;
- **Antecedente de DST:** positivo ou negativo, conforme relato da paciente;
- **Método contraceptivo:** método contraceptivo adotado pela paciente nos últimos seis meses - nenhum, ACO (contraceptivo oral hormonal), ACI (contraceptivo injetável), barreira (condom masculino ou feminino) e LTB (laqueadura bilateral) ou vasectomia (masculina). Uso de condom masculino: frequente, ocasionalmente (raras vezes) e negativo (nunca houve uso);

- **Tipo de flora vaginal na bacterioscopia do conteúdo vaginal com coloração pelo método de Gram** (Bozzini, 1993; Linhares et al, 1995):

Flora tipo I: presença de células epiteliais, raros polimorfonucleares ou ausência destes. Flora bacteriana representada por 90% a 95% de *Lactobacilos de Doderlein* e 5 a 10% por outros gêneros bacterianos;

Flora tipo II: presença de células epiteliais ,raros ou moderados polimorfonucleares; flora bacteriana representada por cerca de 50% de *Lactobacilos de Doderlein* e 50% por outros gêneros bacterianos;

Flora tipo III: presença de células epiteliais, raros polimorfonucleares, flora bacteriana com 5% ou menos de *Lactobacilos de Doderlein* e 95% ou mais de outros gêneros bacterianos.

- **Citologia oncótica cervicovaginal:** conforme classificação de Papanicolaou.

A coleta foi realizada durante o exame ginecológico, após colocação de espéculo vaginal. Utilizou-se espátula de Ayre (de madeira) para coleta de amostra do raspado do epitélio escamoso e de parede vaginal e uso do *citobrush* (escova) para amostra do epitélio glandular. O conteúdo foi disposto em forma de esfregaço em lâmina de vidro e fixado em álcool etílico absoluto de uso comercial para futura leitura sob coloração de Papanicolaou realizada no Laboratório de Citopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5. Método estatístico

As medidas quantitativas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média e desvio padrão) e comparadas entre os grupos com uso de testes t - Student. As medidas qualitativas foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e realizados testes de associação qui-quadrado para verificar existência de associação entre os grupos e as medidas de interesse.

Foi utilizado *Statistical Package for the Social Sciences* versão 15.0.

O poder de significância foi estabelecido em 5%.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 ilustra as variáveis de idade, raça e antecedentes de DST.

Em relação à idade e à raça não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Porém, em relação às DST houve incidência maior no grupo estudo, sendo 15 (15%) casos de HPV; 5 (5%) de *Chlamydia trachomatis* e 3 (3%) de herpes genital.

Tabela 1. Características gerais e antecedentes de DST de mulheres com e sem CVVR

	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Idade média	32,43	29,91	0,015
Raça			
Branca	84%	83%	
Negra	10%	9%	
Amarela	6%	3%	
Parda	0%	5%	
Antecedentes de DST	16%	0%	<0,001

A Tabela 2 ilustra o grau de instrução de ambos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 2. Escolaridade referida pelas mulheres com e sem CVVR

Grau de instrução	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Fundamental	14%	9%	0,228
Médio	47%	48%	
Superior	37%	43%	
Pós-graduação	2%	0%	

Com relação ao início da atividade sexual, não foi encontrada diferença significativa entre as médias da idade da primeira relação sexual, sendo 17,5 anos no grupo com candidíase vulvovaginal recorrente e 18,1 anos no grupo controle.

Em relação aos antecedentes obstétricos observa-se na Tabela 3 maior frequência da nuliparidade no grupo B, enquanto que no grupo A, a multiparidade foi mais frequente. Tais diferenças foram estatisticamente significativas.

Tabela 3. Antecedentes obstétricos das mulheres com e sem CVVR

Paridade	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Nulípara	51 %	70 %	<0,001
Primípara	13 %	20 %	
Múltipara	36 %	10 %	

A Tabela 4 ilustra os métodos contraceptivos adotados nos dois grupos analisados.

Observa-se diferença significativa no uso do método de barreira (condom masculino), sendo maior entre as mulheres do grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao uso dos demais métodos.

Observou-se ainda que 14% das mulheres com CVVR não utilizavam método contraceptivo, quando comparadas às mulheres saudáveis (3%). Tal diferença foi estatisticamente significativa.

Tabela 4. Distribuição dos diferentes métodos anticoncepcionais adotados pelas mulheres com e sem CVVR

MAC	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Nenhum	14%	3%	<0,001
Hormonal	50%	33%	
Barreira	30%	61%	<0,001
Esterilização Tubária	5%	1%	
Vasectomia	1%	0%	
Comportamental	0%	2%	

A Tabela 5 ilustra os sintomas apresentados pelas pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente, sendo os mais frequentes: corrimento, queimação e prurido.

Tabela 5. Sintomas referidos pelas pacientes com CVVR

Sintoma	Presente n = 100	Ausente n = 100
Corrimento	98%	2%
Queimação	89%	11%
Prurido	92%	8%
Disúria	17%	83%
Dispareunia	44%	56%
Dor pélvica	16%	84%

Os dados do exame ginecológico das mulheres portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente encontram-se representados na Tabela 6.

Os sinais mais expressivos foram o aumento do conteúdo vaginal presente em 98% e a mácula rubra em 28% dos casos, respectivamente.

Tabela 6. Achados do exame ginecológico em pacientes com CVVR

Sinais clínicos	Presente n = 100	Ausente n = 100
Aumento do conteúdo vaginal	98%	2%
Úlcera genital	0%	0%
Tumoração	0%	0%
Mácula rubra	28%	72%

A Tabela 7 ilustra o tipo de flora vaginal encontrado nos dois grupos estudados. A flora do tipo I foi a mais frequente no grupo B. Tal achado foi estatisticamente significativo.

Tabela 7. Tipo de flora vaginal segundo a bacterioscopia pelo método de Gram nas pacientes com e sem CVVR

Tipo de flora	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Flora tipo I	3%	30%	<0,001
Flora tipo II	89%	70%	
Flora tipo III	8%	0%	

A Tabela 8 ilustra os resultados da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou.

Observa-se que o grupo com CVVR apresenta maior frequência (15%) de citologia classe III, quando comparadas com o grupo de mulheres saudáveis. Tal resultado foi estatisticamente significativo.

Tabela 8. Resultado da citologia oncológica cervicovaginal segundo Papanicolaou

Papanicolaou	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
CLASSE I	0%	8%	<0,001
CLASSE II	85%	92%	
CLASSE III	15%	0%	

A Tabela 9 ilustra o número de parceiros sexuais nos últimos seis meses de ambos os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9. Número de parceiros sexuais nos últimos seis meses referidos pelas pacientes com e sem CVVR

Número de parceiros sexuais	Grupo A n=100	Grupo B n=100	p
Um parceiro	95%	91%	0,338
Dois parceiros	5%	8%	
Três parceiros	0%	1%	
Quatro ou mais parceiros	0%	0%	

A Tabela 10 ilustra a frequência do polimorfismo no códon 54 do gen que codifica a lecitina ligadora de manose. Observa-se que a prevalência do genótipo AA (selvagem) foi mais elevada no grupo controle do que no grupo estudo (CVVR), oposto do observado com a prevalência do genótipo BB, o qual foi maior no grupo estudo (CVVR).

Ao observar separadamente os alelos A e B, verifica-se diferença estatisticamente significativa, sendo que o alelo A é mais prevalente no grupo controle. Quanto ao alelo B, o qual sinaliza para o genótipo polimórfico, há maior prevalência no grupo estudo (CVVR).

Tabela 10. Polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a MBL em mulheres com e sem CVVR

Genótipo	Alelo	Grupo A n=100	Grupo B n=100
A,A		58 (58%)	84 (84%) ^a
A,B		30 (30%)	15 (15%)
B,B		12 (12%)	1 (1%) ^b
	A	146	183
	B	54 (27,0%)	17 (8,5%) ^c

^ap = <0,0001, razão de chance (OR) = 0,2630, 95% intervalo de confiança (CI) = 0,1351, 0,5121; ^bp = 0,0025, OR = 13,5, 95% CI = 1,720, 105,9; ^cp = <0,0001, OR = 3,981, 95% CI = 2,214, 7,161

A Tabela 11 ilustra a frequência do polimorfismo do gene que codifica a IL1-Ra em mulheres com CVVR. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os diferentes polimorfismos entre os dois grupos.

Tabela 11. Polimorfismo do gene que codifica o IL1-Ra em mulheres com e sem CVVR

Genótipo	Alelo	Grupo A n=75	Grupo B n=75
1,1		43 (57,3%)	45 (60,0%)
1,2		20 (26,7%)	21 (28,0%)
1,3		3 (4,0%)	1 (1,3%)
1,4		1 (1,3%)	0
2,2		8 (10,7%)	6 (8,0%)
2,3		0	1(1,3%)
2,4		0	1 (1,3%)
	1	110 (73,3%)	112 (74,7%)
	2	36 (24,0%)	35 (23,4%)
	3	3 (2,0%)	2 (1,3%)
	4	1 (0,7%)	1 (0,7%)

A Tabela 12 ilustra as associações entre os polimorfismos nos genes que codificam o IL-1Ra e MBL nas pacientes com CVVR. Observa-se menor frequência dos genótipos AA da MBL e 1,1 da IL1-Ra no grupo das mulheres com CVVR em relação ao grupo controle. Tais resultados foram estatisticamente significativos. Observa-se também diferença significativa nos genótipos A,B da MBL e 1,1 da IL-Ra no grupo estudo quando comparado ao grupo controle.

Tabela 12. Polimorfismo dos genes que codificam a MBL e o IL-Ra em mulheres com e sem CVVR

Genótipos		Grupo A n=75	Grupo B n=75
MBL	IL-1Ra		
A,A	1,1	24 (32,0%) ^a	42 (56,0%)
A,A	1,2	13 (17,3%)	15 (20,0%)
A,A	1,3	0	1 (1,3%)
A,A	1,4	1 (1,3%)	0
A,A	2,2	5 (6,7%)	4 (5,3%)
A,B	1,1	16 (21,3%) ^b	2 (2,7%)
A,B	1,2	6 (8,0%)	8 (10,7%)
A,B	1,3	3 (4,0%)	0
A,B	2,2	0	2 (2,7%)
B,B	1,1	3 (4,0)	1 (1,3%)
B,B	1,2	2 (2,7%)	0
B,B	2,2	2 (2,7%)	0

^ap = 0,0050 vs. razão de chance = 0,3697, 95% intervalo de confiança= 0,1900, 0,7196

^bp = 0,0007 vs. razão de chance = 9,898, 95% intervalo de confiança = 2,187, 44,801

Pode-se observar na Tabela 13 a relação entre os sintomas apresentados pelas mulheres com CVVR e o polimorfismo no gen que codifica a MBL. O alelo B foi mais frequente em mulheres com queixas de dor pélvica, quando comparadas às mulheres sem esta queixa, sendo tal diferença estatisticamente significativa.

Tabela 13. Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Queimação	AA		50 (56,8%)	6 (60,0%)
	AB		29 (33,0%)	1 (10,0%)
	BB		9 (10,2%)	3 (30,0%)
		A	129 (73,3%)	13 (65,0%)
		B	47 (26,7%)	7 (35,0%)
Prurido	AA		50 (54,9%)	7 (87,5%)
	AB		30 (33,0%)	0
	BB		11 (12,1%)	1 (12,5%)
		A	130 (71,4%)	14 (87,5%)
		B	52 (28,6%)	2 (12,5%)
Dispareunia	AA		29 (65,9%)	28 (50,9%)
	AB		10 (22,7%)	20 (36,4%)
	BB		5 (11,4%)	7 (12,7%)
		A	68 (77,3%)	76 (69,1%)
		B	20 (22,7%)	34 (30,9%)

continua

Tabela 13. Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas clínicos em mulheres com CVVR (conclusão)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Dor pélvica	AA		12 (75,0%)	44 (53,7%)
	AB		4 (25,0%)	26 (31,7%)
	BB		0	12 (14,6%)
		A	28 (87,5%)	114 (69,5%)
		B	4 (12,5%)	50 (30,5%) ^a
Disúria	AA		7 (46,7%)	49 (59,8%)
	AB		7 (46,7%)	22 (26,8%)
	BB		1 (6,7%)	11 (13,4%)
		A	21 (70,0%)	120 (73,2%)
		B	9 (30,0%)	44 (26,8%)

^aP = 0,05 vs. dor pélvica, razão de chance = 3,070, 95% intervalo de confiança = 1,023, 9,218

A Tabela 14 ilustra as relações das principais queixas ginecológicas referidas pelas pacientes com CVVR com o polimorfismo no gene que codifica o IL-1Ra. Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas.

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Queimação	1,1		39 (5,4)	4 (50,0)
	1,2		19 (27,9)	2 (25,0)
	1,3		2 (2,9)	1 (12,5)
	2,2		8 (1,8)	0
	1,4		0	1 (12,5)
		1	99 (72,8)	12 (75,0)
		2	35 (25,7)	2 (12,5)
		3	2 (1,5)	1 (6,3)
		4	0	1 (6,3)
Prurido	1,1		42 (58,3)	2 (40,0)
	1,2		19 (26,4)	2 (40,0)
	1,3		3 (4,2)	0
	2,2		8 (11,1)	0
	1,4		0	1 (20,0)
		1	6 (73,6)	7 (70,0)
		2	35 (24,3)	2 (20,0)
		3	3 (2,1)	0

continua

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR (continuação)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Dispareunia	1,1		17 (53,1)	27 (60,0)
	1,2		11 (34,4)	10 (22,2)
	1,3		0	3 (6,7)
	2,2		4 (12,5)	4 (8,9)
	1,4		0	1 (2,2)
		1	45 (70,3)	68 (75,6)
		2	19 (29,7)	18 (20,0)
		3	0	3 (3,3)
		4	0	1 (1,1)
Dor pélvica	1,1		7 (50,0)	37 (58,7)
	1,2		6 (42,8)	15 (23,8)
	1,3		0	3 (5,1)
	2,2		1 (7,1)	7 (11,1)
	1,4		0	1 (1,6)
		1	20 (71,4)	93 (73,8)
		2	8 (28,6)	29 (23,0)
		3	0	3 (2,4)
		4	0	1 (0,8)

continua

Tabela 14. Polimorfismo do gene que codifica o IL-1R e sintomas em mulheres com CVVR (conclusão)

Sintomas	Genótipo	Alelo	Presente	Ausente
Disúria	1,1		7 (50,0)	36 (58,1)
		1,2	4 (28,6)	17 (27,4)
		1,3	2 (14,3)	1 (1,6)
		2,2	1 (7,1)	7 (11,3)
		1,4	0	1 (1,6)
		1	20 (71,4)	91 (73,4)
		2	6 (21,4)	31 (25,0)
		3	2 (7,1)	1 (0,8)
		4	0	1 (0,8)

5. DISCUSSÃO

As vulvovaginites representam uma das principais causas que levam as pacientes a procurar ajuda médica nos ambulatórios e clínicas ginecológicas. Dentre estas, a candidíase vulvovaginal é uma das mais frequentes, sendo a *Candida sp.* o agente etiológico.

As recidivas ocorrem em aproximadamente 5% dos casos.

As mulheres que apresentam episódios recorrentes de candidíase vulvovaginal têm uma qualidade de vida ruim, afetando todos os aspectos: pessoal, profissional, social, financeiro e sexual. Para muitas mulheres esses episódios ocorrerão durante grande parte de suas vidas no menacme, ou seja, período de maior potencial físico, emocional, intelectual e reprodutivo, obrigando-as ao uso intermitente de antifúngicos orais e vaginais (Sobel, 1992).

No presente estudo a média etária da população estudada foi semelhante nos dois grupos, sendo 32,43 anos nas mulheres que apresentaram CVVR e 29,91 anos nas mulheres saudáveis.

A raça predominante foi a branca em 80% dos casos tanto no grupo estudo quanto no grupo controle. Tais dados foram semelhantes aos encontrados por Giraldo et al (2007), que encontrou a média de 31,5 anos para o grupo de mulheres com CVVR e 33,5 anos no grupo controle, respectivamente.

Com relação aos antecedentes de DST, observou-se maior prevalência (16%) no grupo de pacientes com CVVR. Tais resultados foram

estatisticamente significantes. Interessante notar que as DST foram representadas por *Chlamydia trachomatis* (5%) e HPV (15%), doenças que requerem a imunidade celular (TH1) para combatê-las. Embora a CVVR não tenha seus mecanismos fisiopatogênicos totalmente elucidados, não existe dúvida da importância da imunidade celular. Talvez a infecção concomitante por *Chlamydia trachomatis* e HPV pudessem de alguma maneira, comprometer a defesa do trato genital, permitindo a proliferação dos fungos e conseqüentemente o aparecimento das recorrências.

Ao analisar o grau de instrução, ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas. Um aspecto que chama a atenção, onde duas mulheres pertencentes ao grupo de CVVR eram pós graduadas. Embora este número seja pequeno, levou-se em consideração a possibilidade do “stress” afetar o estado imune com conseqüente redução da imunidade local, permitindo o desenvolvimento da *Candida sp*, desencadeando o processo infeccioso.

Não houve diferença significativa na média das idades da primeira relação sexual entre os dois grupos, sendo a média entre 17,5 e 18,1 anos, respectivamente.

Em relação aos antecedentes obstétricos observou-se maior frequência de multiparidade no grupo com CVVR (36%) quando comparadas a mulheres saudáveis (10%). Aventou-se a possibilidade de que, embora a assistência ao parto tenha evoluído, oferecendo melhores condições às parturientes, as próprias modificações gravídicas locais e lacerações do colo uterino, assim como as alterações da flora vaginal e possível instabilidade do

sistema imune do trato genital poderiam contribuir para a instalação de processo inflamatório e eventualmente levar à alteração da imunidade celular local. Tais fatos poderiam explicar o maior número de múltiparas no grupo estudo.

Com relação aos métodos contraceptivos, observou-se que apenas 30% das mulheres com CVVR utilizam método de barreira. Embora a CVVR não seja considerada doença de transmissão sexual, o sexo desprotegido pelo uso de outros métodos expõe o trato genital inferior à ação supressora do sêmen, além de agentes sexualmente transmissíveis. Assim, mulheres com deficiências específica na imunidade do trato genital estariam mais sujeitas à proliferação de fungos, que passariam do estado saprófita para o estado de microrganismos causadores de infecção.

Alguns estudos já demonstraram que a presença do sêmen na vagina pode desencadear processo alérgico inibindo a imunidade celular local. Sabe-se que a produção de prostaglandina E₂ induzida pela alergia ao sêmen ou a uma variedade de outros alérgenos, possui ação inibitória potente sobre a imunidade celular, prevenindo a ativação dos linfócitos e assim inibindo a imunidade anticândida (Witkin, 1987b). O sêmen também induz a produção de interleucinas que podem inibir a ativação de macrófagos responsáveis pelo fenômeno de fagocitose fúngica (Witkin et al, 1998; Jeremias et al, 1998).

Por outro lado Giraldo et al (2000) e Witkin et al (2002) ressaltaram o fato de que tais mecanismos de hipersensibilidade local podem resultar em

sintomas genitais semelhantes aos sintomas encontrados nas infecções fúngicas e que podem, por vezes, confundir o diagnóstico.

Em concordância com os estudos realizados por Nyirjesy et al, (2001); Liu et al, (2006); Fan et al, (2008) verificou-se no presente trabalho que as queixas mais frequentes das mulheres do grupo que apresentava CVVR foram: corrimento (96%), prurido (92%) e queimação (89%). Em menor frequência foram referidas dispareunia (44%) e dor pélvica (16%) e disúria (17%). Tais sintomas provavelmente devem-se ao processo inflamatório associado à candidíase vulvovaginal recorrente.

Dentre os sinais encontrados durante o exame ginecológico, além do aumento do conteúdo vaginal, destaca-se a presença de mácula rubra, eversão do epitélio glandular, que ocorre na maioria das vezes em resposta a um meio hostil. Tal alteração foi encontrada em 28 (28%) pacientes que apresentavam CVVR. Importante lembrar que mulheres jovens portadoras de mácula rubra tem maior possibilidade de apresentarem infecção por *Chlamydia trachomatis*. Assim em presença da CVVR poderia ser sugerida a pesquisa de tal bactéria.

O tipo de flora vaginal predominante nas mulheres com CVVR foi o tipo II (89%) dos casos, onde foram encontrados 50% de *Lactobacillus de Doderlein* e 50% de outros gêneros bacterianos. Embora não fosse objetivo deste estudo analisar as diferentes cepas de *Lactobacillus* e relacioná-los com a CVVR, talvez tais diferenças possam explicar as correlações dos mesmos com a infecção fúngica.

No que se refere a citologia oncológica cervico vaginal, 85% das mulheres com quadros recidivantes de candidíase vulvovaginal apresentaram classe II segundo a classificação de Papanicolaou, ou exame satisfatório, porém negativo para neoplasia, segundo classificação de Bethesda; 15% apresentaram classificação III de Papanicolaou e suspeito na classificação por Bethesda, e apenas 1% apresentou classificação I de Papanicolaou e negativo segundo Bethesda. Portanto, os resultados no presente estudo sugerem que a infecção pela *Candida sp* não está associada com alterações intra epiteliais relevantes.

Entretanto, a presença de classe III em 15% das pacientes com CVVR mais uma vez aponta para a possibilidade de associação com agentes sexualmente transmissíveis, neste caso o HPV.

Ambos os grupos mostraram-se homogêneos com relação ao número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, referindo quase que na totalidade um único parceiro até o momento da pesquisa. Segundo alguns estudos parece que o parceiro sexual não desempenha papel relevante nas recidivas das candidíases. Nyirjesy et al (1995), em seu estudo demonstraram que os parceiros das mulheres com CVVR apresentavam em sua maioria cultura negativa para fungos, assim não sendo provavelmente, a fonte das reinfecções. Além disso, o tratamento dos parceiros não diminuiu as recorrências da candidíase em suas parceiras.

Alguns autores tem ressaltado a importância do sistema imune na gênese da candidíase vulvovaginal recorrente. A tendência da maioria dos estudos é centralizar a participação do sistema imune no processo de

repetição da infecção vaginal fúngica (Witkin, 1987b; Witkin et al, 1988; Witkin et al, 2000; Fidel, 2005; Giraldo et al, 2007).

Os mecanismos das respostas imunes, tanto o da inata quanto o da adquirida, constituem um sistema integrado complexo de defesa do hospedeiro, envolvendo inúmeras células, constituintes protéicos e mediadores químicos específicos. A formação, regulação, liberação e atividade de tais elementos é geneticamente determinada.

Por outro lado, cada vez mais tem sido ressaltado a importância da constituição genética de cada indivíduo, onde simples trocas de um único nucleotídeo por outro, na constituição de determinado gen, levaria a formação de uma proteína instável e resultaria em algum dano à saúde (Witkin et al, 2002). Os polimorfismos, ou seja as diferentes formas que o gene pode se apresentar, responderiam a algumas dúvidas sobre diversas doenças.

Estudos prévios tem demonstrado que a lecitina ligadora de manose (MBL) apresenta papel importante na defesa contra a vulvovaginite fúngica, fazendo parte da primeira linha de defesa contra a proliferação pela *C. albicans*. A deficiência em tal proteína tem sido associada à candidíase vulvovaginal recorrente (Witkin et al, 2000).

Mesmo entre indivíduos saudáveis com genótipos semelhantes, a concentração de MBL no plasma pode variar e elevados níveis são encontrados durante vigência de quadros infecciosos ou após atos cirúrgicos ou outras injúrias que o indivíduo possa sofrer (Jensenius et al, 2003).

No presente estudo observou-se que o genótipo AA (selvagem) esteve presente em 58% das mulheres com CVVR e em 84% dos controles. Tal diferença foi estatisticamente significativa, ressaltando a importância da secreção adequada de MBL na proteção contra as infecções fúngicas.

De maneira semelhante verificou-se que a prevalência do genótipo BB foi de 12% no grupo com CVVR e de apenas 1% no grupo controle. Tais achados reforçam ainda mais a importância da MBL, como fator de proteção, já que o genótipo BB está associado a deficiência na produção proteína normal e portanto, falha nas defesas contra os fungos.

Na década de 90, alguns pesquisadores vislumbraram a possibilidade da produção de MBL para intervenção terapêutica na candidíase vulvovaginal recorrente. Obtiveram resultados encorajadores com MBL purificado (Jensenius et al, 2003).

Outro importante componente do sistema imune é a Interleucina 1 (IL-1) que se destaca entre as citocinas pró inflamatórias. O antagonista do receptor desta interleucina (IL1-Ra) é estimulado na presença de alterações inflamatórias persistentes, já que inflamação persistente pode ser prejudicial ao organismo. O IL1-Ra é inibidor competitivo da bioatividade da IL1 (Witkin et al, 2002).

A relação entre IL1 e seu inibidor, a IL1Ra sinalizarão para resposta inflamatória persistente ou para o término deste processo, impedindo que o mesmo se torne crônico. O polimorfismo no gene que codifica para IL1Ra parece desempenhar papel importante no desenvolvimento de várias doenças, tais como colite ulcerativa, *alopecia areata*, lesões cutâneas no

lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves e outras (Arend et al, 1998; Witkin et al, 2002; Sehouli et al, 2003; Wu et al ,2005).

Até o presente momento não foram encontrados na literatura dados correlacionando a CVVR e o polimorfismo no gene que codifica para IL1- Ra. Assim, neste estudo procurou-se relacionar pela primeira vez, o polimorfismo de tal gene às recidivas de vulvovaginite por *Candida sp* em mulheres brasileiras.

Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas no polimorfismo do gene que codifica o antagonista do receptor da interleucina 1 no grupo de mulheres com CVVR e no grupo controle. Assim, embora sejam necessários maiores estudos, pode-se inferir que tal citocina não desempenha papel importante na defesa contra a CVVR.

Ao estudarmos a associação de ambos os polimorfismos: do gene que codifica para o antagonista do receptor da interleucina 1 e do gene que codifica para a lectina ligadora de manose com CVVR, observamos menor frequência dos genótipos AA da MBL e 1,1 da IL1-ra no grupo das mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente em relação ao grupo controle. Ao mesmo tempo observa-se maior frequência dos genótipos AB da MBL e 1,1 da IL1-Ra no grupo estudo quando comparadas às mulheres saudáveis. Tais diferenças foram estatisticamente significantes, levando-nos a pensar que a ação da MBL seja mais marcante e “forte” do que a influência da IL1-Ra no processo da candidíase vulvovaginal recorrente.

Além do papel protetor que a MBL desempenha contra a CVVR, esta proteína também parece inibir infecção por *Chlamydia trachomatis*. Swanson

& Kuo (1991) observaram que a MBL ligava-se ao grupo açúcar presente na membrana desta bactéria em cultura de células. Sziller et al (2007), em estudo realizado com mulheres húngaras, demonstraram que o alelo heterozigoto B da MBL estava fortemente associado com a oclusão da tuba de Falópio e que mulheres que apresentavam alelo selvagem A estavam protegidas contra danos tubários.

No presente estudo observou-se menor prevalência do alelo B em mulheres com CVVR que tinham queixa de dor pélvica. Tal fato sugere que a deficiência da MBL, devido ao alelo B, poderia tornar a mulher mais susceptível à ascensão de microrganismos do trato genital inferior para o trato genital superior causando processo inflamatório e consequentemente dor pélvica.

Talvez ampliando-se o estudo, aumentando o número de pacientes e de controles, ou estudando outros polimorfismos relacionados ao sistema imune, seja possível vislumbrar outros caminhos para elucidar os mecanismos envolvidos nos processos crônicos, o que possibilitaria medidas preventivas e de terapêutica. Tais fatos sem dúvida trariam de volta a qualidade de vida que muitas de nossas pacientes perderam e almejam tanto ter de volta. Assim este trabalho abre outros caminhos para novas pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente apresentaram maior frequência de polimorfismos no códon 54 do gene que codifica a lecitina ligadora de manose (MBL) quando comparadas a mulheres saudáveis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência do polimorfismo do gene que codifica o inibidor do receptor da interleucina 1 (IL1-Ra) entre os grupos estudados.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Memo.CAPPesq - 096/06

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Ilma. Sra.
Dra. Lana Maria Aguiar
DD. Pesquisador
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Por determinação do Senhor Presidente,
Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho, encaminhamos para conhecimento,
cópia do parecer nº 677/2006, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CONEP/MS referente à APROVAÇÃO do protocolo de Pesquisa nº
558/04 - intitulado " Avaliação imunológica de pacientes portadoras de
candidíase vulvovaginal".

Solicitamos observar as recomendações constantes
no referido parecer. (Só se tiver recomendações!!)

Atenciosamente,

MARCIA APARECIDA T. DE CARVALHO

Secretária

Comissão de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2

06/21/2006 18:18 0512266453

CONEP

PAGE 01

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 677/2006

Registro CONEP: 12583 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0457.0.015.000-04

Processo nº 25000.200559/2005-81

Projeto de Pesquisa: "Avaliação Imunológica de Pacientes Portadores de Candidíase Vulvovaginal".

Pesquisador Responsável: Dra. Lana Maria Aguiar

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: Não se aplica (colaboração da Universidade de Cornell/EUA)

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 181/2006, cabem as seguintes considerações:

- Foi apresentado compromisso com a Res. CNS 347/2005, quanto ao armazenamento de material biológico e importância desse procedimento para a instituição brasileira.
- Esclarecimentos metodológicos também foram incorporados ao protocolo.
- Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, a pesquisadora fez as alterações solicitadas, contudo o título "Consentimento Informado" está em desacordo com a Res. CNS 196/96, item IV. Solicita-se ao CEP exigir a correção do documento antes da liberação para o início do estudo.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 21 de junho de 2006.

RECEBIDO POR FAX
Tania
ATA 22/06/06
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq - HCFMUSP

W. Saad Hossne
WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 3

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Avaliação imunológica de pacientes portadoras de candidíase vulvovaginal
2. PESQUISADOR: Lana Maria de Aguiar
- CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
- UNIDADE DO HCFMUSP: ..Disciplina de Ginecologia HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
- RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa – As infecções vaginais por fungos causam corrimento e coceira, que são bastante desagradáveis. Algumas mulheres apresentam infecções recorrentes, ou seja, infecções repetidas que voltam a aparecer algum tempo após o tratamento. O sistema imune do organismo é responsável pela defesa contra infecções e atua em todos os locais do corpo, inclusive no aparelho genital. O objetivo desta pesquisa é avaliar se existem diferenças entre o sistema imune genital de mulheres que tem infecções repetidas por fungos e mulheres que não apresentam este tipo de infecção.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – A senhora fará um exame ginecológico normal e, durante este exame, será colhido com um cotonete de algodão material da vagina para pesquisa de fungos. A seguir, será colocado um pouquinho de líquido em sua vagina (soro fisiológico), que será aspirado com uma seringa (sem agulha) e enviado a um Laboratório nos Estados Unidos, na Universidade de Cornell, em Nova York, onde serão realizados alguns estudos para sabermos a quantidade de algumas substâncias que fazem parte do seu sistema imunológico. Estas substâncias chamam-se interleucinas e interferon. O nosso objetivo quando analisamos estes resultados é saber se há um desequilíbrio nestas substâncias presentes na secreção vaginal e se tem relação com o fato de algumas mulheres terem candidíase diversas vezes. Além disso, o mesmo Laboratório nos Estados Unidos irá realizar uma pesquisa para saber se existe alguma variação no gen que controla a produção da interleucina-1, que age no sistema imunológico. esse gen chama-se "gen codificador da interleucina. Para realizar este exame genético será necessário colher células do lado interno de sua bochecha com um cotonete de algodão. Também neste caso, os resultados de todos os exames das pacientes serão comparados com os resultados dos exames de mulheres que não tiveram candidíase várias vezes. Os dados obtidos serão utilizados apenas para este estudo. Caso os exames confirmem a presença de fungos a senhora receberá tratamento adequado com medicamentos utilizados de rotina no Setor de Infecções do trato reprodutivo.

3. desconfortos e riscos esperados – O desconforto esperado é mínimo, a senhora já sabe que o exame ginecológico é desconfortável e este não é diferente, podendo ocorrer dor passageira apenas durante a colocação do espéculo, que é um instrumento que é introduzido na sua vagina para que o médico observe as paredes e o colo do útero. Todos os demais procedimentos são totalmente indolores e não causam risco para a sua saúde. O material colhido será utilizado somente para este estudo e qualquer outro procedimento somente poderá ser realizado com a sua autorização específica, mediante um novo Termo de Consentimento. A Sra. terá sua identidade e privacidade preservada durante e após a pesquisa. Apenas os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso ao seu prontuário médico.

4. benefícios que poderão ser obtidos – Com os resultados destes exames poderemos saber se a senhora possui alguma deficiência no sistema imune no trato genital, que facilite o aparecimento de infecções por fungos. As informações científicas obtidas poderão ser divulgadas em congressos e publicadas em revistas científicas, porém sem sua identificação

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo – Até o momento não existem outros benefícios na participação deste estudo. Entretanto, caso a deficiência do sistema de

defesa seja comprovada, poderão ser criados medicamentos que, além de matarem os fungos causadores da infecção, também estimulem as defesas naturais.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, estando a disposição o Pronto Socorro de Ginecologia e os pesquisadores, nos telefones 3069-6647 e 3082-7394.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Drª Lana Maria Aguiar e Iara Moreno Linhares 3069-7838

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 20 de outubro de 2005

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

PROJETO DE PESQUISA
AValiação imunológica de pacientes portadoras de
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

CONSENTIMENTO INFORMADO

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa sobre inflamação na vagina causada por fungos (os médicos chamam de “candidíase vaginal”). Gostaríamos de explicar a importância dessa pesquisa e os passos envolvidos na participação.

- 1- A inflamação da vagina causada por fungos provoca corrimento e coceira nos órgãos genitais. Algumas mulheres apresentam esse problema com frequência, ou seja, a inflamação volta a aparecer algum tempo depois de terminado o tratamento.
- 2- O sistema imune é responsável pelas defesas do organismo. Estudos feitos fora do Brasil mostraram que mulheres americanas que têm inflamações repetidas por fungos apresentam alguma alteração no sistema imune.
- 3- As características de cada pessoa são determinadas pelos gens. Isso inclui a maneira como cada organismo vai fazer as suas defesas. Entretanto, algumas vezes os genes podem apresentar pequenas modificações na sua estrutura, o que poderá prejudicar a ação do sistema imune.
- 4- O objetivo desta pesquisa é verificar se mulheres BRASILEIRAS que apresentam inflamações repetidas por fungos têm alguma alteração no sistema imune que facilite o aparecimento do problema (ou seja, como funciona a defesa do organismo dessas mulheres).
- 5- A participação na pesquisa envolve risco mínimo. Haverá um pequeno desconforto ao colocar-se um cotonete de algodão na parte de dentro da bochecha e esfregar de leve. Será também realizado o exame vaginal. Caso concorde em participar, a senhora responderá a algumas perguntas de seu médico, passará por um exame ginecológico onde será colhido material da vagina para verificar a presença de fungos. A seguir será colocado um pouquinho de líquido frio em sua vagina e aspirado para estudo do sistema imune. Este material será enviado para um laboratório especializado dos Estados Unidos. O último passo será a coleta de algumas células de sua boca, feita girando-se um cotonete de algodão algumas vezes contra a bochecha. Estas células da boca servirão para o estudo dos genes que determinam algumas das ações do sistema imune. Também este material será enviado para o mesmo laboratório dos Estados Unidos, sendo utilizado EXCLUSIVAMENTE para a realização desta pesquisa. Todos os procedimentos são rápidos e indolores. O material enviado ao laboratório ficará guardado por um período de 5 anos.
- 6- Caso os exames confirmem a presença de inflamação por fungos a senhora receberá o tratamento adequado.
- 7- A senhora será informada sobre os resultados dos exames realizados. Não existem outras vantagens na participação, porém a senhora estará contribuindo para o melhor conhecimento sobre o assunto, o que poderá ajudar na descoberta de

melhores tratamentos ou maneiras de prevenir a inflamação. Os resultados serão explicados para a senhora durante as consultas agendadas.

8- Todas as informações obtidas no estudo são CONFIDENCIAIS.

9- A sua decisão de participar ou não participar do estudo não alterará o atendimento que a senhora tem recebido neste hospital. Mesmo que prefira não participar, continuará a ser atendida da mesma maneira.

DECLARO QUE LI E ENTENDI O PRESENTE TERMO DE CONSENTIMENTO E ACEITO EM PARTICIPAR DA PEQUISA

Nome e assinatura da paciente

Nome e assinatura do investigador

Nome e assinatura de testemunha

Data

Telefones para contato Dra Lana Aguiar, Dra Iara Linhares: 3069-6000

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FMUSP**SERVIÇO DE INFECÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO (DST/AIDS)**favor fazer um círculo nos achados positivos

Protocolos / data _____

Número ficha DST (A) Registro HC _____ Data _____

Nome _____

Endereço _____

Telefone _____

RAÇA - Branca - Negra - Amarela - Outra (_____)

ESTADO CIVIL - Solteira - Casada - Viúva - União Consensual

ESCOLARIDADE - Analfabeta - 1º Grau - 2º Grau - Superior - Pós-Graduação

PROFISSÃO _____

QUEIXA	Corrimento	Odor fétido	Queimação	Prurido	Dispareunia
	Disuria	Dor pélvica	Úlcera	Tumor	
	Outra (especificar) _____				

ANTECED PESSOAIS _____

ANTECEDENTES FAMILIARES _____

GESTAÇÕES _____ PARIDADE _____ (_____ partos normais _____ cesáreas)

ABORTOS: Espontâneos _____ Provocados _____ INFECÇÃO pós-parto / aborto

IDADE PRIMEIRO COITO _____	Nº PARCEIROS	Últimos 6 meses _____
		Total _____

FREQÜÊNCIA MENSAL COITO Vaginal _____ Oral receptivo _____ Anal _____

HISTÓRIA VIOLÊNCIA SEXUAL _____ Idade _____

USO PRESERVATIVO	MASCULINO	sempre	ocasionalmente	nunca
	FEMININO	sempre	ocasionalmente	nunca

MÉTODO CONTRACEPTIVO _____

HISTÓRIA DE DST anterior Sim (_____) Não

Uso de drogas (_____) Parceiro (_____)

Alcoolismo - Duchas - Absorvente interno - Absorvente diário

Doenças autoimunes - Alergias - Doenças endócrinas
 Transfusão sangue / derivado
 Outros _____

CICLO MENSTRUAL Duração ____ dias Intervalo ____ dias UM ____/____/____
 Quantidade normal aumentada diminuída Dismenorreia

MEDICAÇÕES _____

EXAME FÍSICO Lesões pele / lesões mucosas hiperchrom. hipochrom. avermelh
 Localização _____
 Mamas _____
 Dor palpação hipogástrico _____
 Lesões genitais _____
 Dor contato com o vestíbulo _____
 Aspecto conteúdo vaginal fisiológico alterado _____
 Quantidade normal aumentada diminuída
 Odor fétido (whiff positivo) Medida pH vaginal _____
 Corrimento cervical _____
 Mácula rubra _____ Dor a mobilização colo _____
 Dor avaliação útero Dor avaliação anexos _____
 Espessamento ou massa anexial _____

OBSERVAÇÕES _____

MÉDICO _____

RESULTADO DE EXAMES

data _____

EXAME A FRESCO soro _____
 KOH _____

GRAM VAGINAL	Cels epitel.	ausentes	raras	moderadas	abundantes
Leucócitos	a	r	m	a	
Doderlein	a	r	m	a	
Gram posit	a	r	m	a	
Gram neg	a	r	m	a	
Leveduras	presentes	ausentes			
Clue cells	presentes	ausentes			
Tricomonas	presentes	ausentes			
Outros	_____				

GRAM CERVICAL Leucócitos ausentes raros moderados abundantes

OBSERVAÇÕES _____

CULTURA CONTEÚDO VAGINAL _____

ENDOCERVICE

Clamidia:	positivo	negativo (método: _____)
Neisseria:	positivo	negativo (método: _____)
Micoplasmas:	positivo	negativo (método: _____)
Ureaplasma:	positivo	negativo (método: _____)

TESTES SOROLÓGICOS

HIV	positiva	negativa			
Herpes	IgG negativo	positivo	IGM positivo	negativo	(título: _____)
CMV	IgG negativo	positivo	IGM positivo	negativo	(título: _____)
HTLV	positiva	negativa			
HEPATITES	positiva	negativa (especificar A, B, C, D _____)			
RSS	negativo	positivo (título: _____)	FTAbs	negativo	positivo

CITOLOGIA _____ data _____

COLPOSCOPIA _____

ANATOMO-PATOL. _____

DIAGNÓSTICO PROVISÓRIO _____

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO _____

CONDUTA _____

RETORNO _____

MÉDICO _____

EVOLUÇÕES (SUMÁRIO)

(favor adicionar folhas do hospital para continuar o sumário das evoluções)

8. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Propriedades gerais das respostas imunes. In: *Imunologia celular e molecular*. 3ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.4-11.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:27-53.

Babula O, Lazdāne G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose binding lectin, and a mannose binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis*. 2003;37:733-7.

Babula O, Lazdāne G, Kroica J, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Frequency of interleukin 4 (IL-4) 589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannose binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1258-62.

Boniotto M, Braidia L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med*. 2005;83: 308-15.

Bozzini N. Avaliação da flora vaginal no pré e pós operatório de mulheres submetidas à histerectomia total abdominal por doença benigna. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1993.

Burger D, Dayer JM. IL1-Ra. In: Oppenhermand JJ, Feldmann M. *Cytokine*. London: Academic Press; 2000. p 319-36.

Chaves JHB, Babayan A, Bezerra CM, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal Interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre term birth. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60:312-317.

Correa PR, David PRS, Peres NP, Cunha KC, Almeida MTG. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;3:177-81.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol*. 1991;45:187-218.

Dinarelli,CA. Biologic basis for interleukin-1 disease. *Blood*. 1996 ;87:2095-147.

DeSeta F, Maso G; Piccolo M, Bianchini E, Crovella S, de Santo D, Caterina P, Guaschino S. The role of mannose binding lectin gene polymorphisms in

women with recurrent bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(6):613e1-3.

Donders GGG, Prenen H, Venbeke G, Reybrouck R. Impaired tolerance for glucose in women with recurrent vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:989-93.

Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. *J Bras Doenças Sex Trans.* 1998;10:4-14.

Fan SR, Liao QP, Liu XP; Liu ZH, Zhang D. Vaginal allergic response in women with vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynecol Obstet.* 2008;101:27-30.

Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Reviews.* 1996;9:335-48.

Fidel PL, Ginsburg KA, Cutright JL, Wolf NA, Leaman D, Dunlap K, Sobel JD. Vaginal associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-Type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *Infect Dis.* 1997;176:728-39.

Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiology.* 2004;12(5):220-27.

Fidel PL. Immunity in vaginal candidiasis. *Cur Opin Infect Dis.* 2005;18:107-111.

Fidel PL. History and Update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57:2-12.

Fischer LD, Van Belle G. *Bioestatistics: a methodology for health sciences.* New York; John Wiley & Sons: 1993. 991p.

Forte WN. Sistema Complemento. In: *Imunologia Básica e Aplicada.* São Paulo: Artmed; 2000. p.41-51.

Forte WN. Citocinas. In: *Imunologia Básica e Aplicada.* São Paulo: Artmed; 2000. p.142-153.

Gadjeva M, Takashaki K, Thiel S. Mannose binding lectin-a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol.* 2004;41:113-21.

Giraldo PC, Von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares IM, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 2000;95: 413-6.

Giraldo PC, Babula O, Gonçalves AK, Linhares IM, Amaral RL, Ledger WJ, Witkin SS. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2007;109:1123-8.

Horovitz B. Mycotic vulvovaginites: a broad overview. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165 (Suppl 2):1188-92.

Huang YF, Wang W, Han JY, WX W, Zhang ST, Liu J, Hug G, Xiong P, Hamvas RM, Wood N, Gong FL, Bittles AH. Increased frequency of the mannose binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Euro J Immunogenet.* 2003;30:121-4.

Hurley R. Recurrent *Candida* infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1981;8:209-3.

Ip WK, Lau YL, Chan SY, Mok CC, Chan D, Tong KK, Lau CS. Mannose-binding lectin and arthritis in southern Chinese. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1679-87.

Janeway Jr CA, Travers P. Conceitos básicos em imunologia. In: Janeway Jr CA, Travers P. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.* 1997. p.1-56.

Jensenius JC, Jensen PH, McGuire K, Lassen JL, Thiel S. Recombinant mannan-binding lectin (MBL) for therapy. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:763-7.

Jeremias J, Ledger WJ, Witkin SS. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in women with vulvar vestibulitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 182:283-5.

Linhares IM, Siqueira LFG, Miranda SD, Reali C, Queiroz JA, Fonseca AM, Bagnoli VR. Vaginose bacteriana: experiência com o tianfenicol. *J Bras Ginecol.* 1995;105:405-9.

Linhares IM, Giraldo PC, Caetano ME, Nissan MD, Gonçalves AKS, Giraldo HPD. Candidíase vulvovaginal recorrente: fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. *Rev Cienc Med.* 2005;14:373-8.

Liu F, Liao Q, Liu Z. Mannose binding lectin and vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 92:43-7.

Lyczack JB. Innate Immunity In: *Immunology, infection, and immunity*. Pier GB, Lyczack JB, Wetzler LM. 2004, 29-46.

Mardh PA, Rodrigues AG, Genç M, Novikova N, Oliveira JM, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology clinical manifestations diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD & Aids.* 2002;13:522-39.

Mardh PA, Sziller I, Lolbert V, Novik N; Kristof K, Rodrigues AG, Vaz CP, Oliveira M. *Candida glabrata* with special reference to European epidemiology. Review and presentation of new data. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005;17;2:73-80.

Milanese M, Segat L, DeSeta F, Pirulli D, Fabris A, Morgutti M, Crovella S. MBL 2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59:146-51.

Neves, NA, Carvalho LP, De Oliveira MA, Giraldo PC, Bacelar O, Cruz AA, .Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:167-71.

Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:820-3.

Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Phys*. 2001;63:697-702.

Pellis V, De Seta F, Crovella S, Bossi F, Bulla R, Guashino S, Radillo O, Garred,P, Tedesco F. Mannose binding lectin and C3 act as recognition molecules for infectious agents in the vagina. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:120-6.

Pier,GB. Immunity. In: Pier GB, Lyczack JB, Wetzler LM. *Immunology, infection, and immunity*. ASM Press: Washington D.C., 2004. p.47-52.

Piccinni MP, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gomez MJ, Guedizi MG, Biagiotti R, Cassone A, Romagnani S, Maggi E. Type 1 T Helper cells specific for *Candida albicans* antigens in peripheral blood and vaginal mucosa of women with recurrent vaginal candidiasis. *Infect Dis*. 2002;186:87-93.

Roitt I, Brostoff J. Male D. *Immunology*. 15ed. Mosby International Ltd., 1998.

Roitt,I, Rabson A. Imunidade Inata. In: *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.1-9.

Sehouli J, Mustea A, Dominique K, Lichtenegger W. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biom Prev*. 2003;12:1205-1208.

Segat L, Silva VLR, Montenegro MF, Santos B, Arraes LC, Crovella S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene(MBL 2) in Brazilian patients with HIV infection. *Clin Immunol*. 2007;124:13-7.

Sobel JD. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;544:547-557.

Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis.

Clin Infect Dis. 1992;14(suppl 1):5148-53.

Sobel JD. Candidal vaginitis. *Clin Obstet Gynecol.* 1993;36:153-65.

Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;152:924-35.

Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369:1961-71.

Stewart DE, Wheilan CI, Fong IW, Tessler KM. Physicossocial aspects of chronic, clinically unconfirmed vulvovaginitis. *Obstet Gynecol.* 1990;76:852-6.

Swanson AF, Kuo CC. Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosilated. *Infect Immun.* 1991;59:2120-25.

Sziller I, Babula O, Ujházy A, Nagy B, Hupuczi P, Papp Z, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin S S. *Chlamydia trachomatis* infection, fallopian damage and a mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism. *Hum Reprod.* 2007;22:1861-65.

Tamandani DMK, Sobti RC, Shekari M, Kaur S., Huria A. Impact of polymorphism in IL1-ra gene on the risk of cervical câncer. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277:527-533.

Tosi MF. Innate immune responses to infection. *Allergy Clin Immunol.* 2005;116:241-9.

Weissenbacher T, Witkin SS, Ledger WJ, Tolbert V, Ginkel M, Scholz C, Weissenbacher ER, Friese K, Mylonas J. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detetion of Candida species by culture and polymerase chain reaction. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279:125-9.

Witkin SS. Transient local Immunosuppresion in recurrent vaginitis. *Immunol Today.* 1987a;8:360-3.

Witkin SS. Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immuno Microbiol.* 1987b;15:34-7.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA Recurrent vaginitis as a result of sexual transmission of IGE antibodies. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:32-6.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *candida albicans* in women with recurrent vaginitis. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:57-8.

Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M, Ledger WJ. Effect of *candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis.* 1991;164:396-9.

Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJA. Localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J Allergy Immunol.* 1998;81:412-6.

Witkin SS, Giraldo PC, Linhares IM. New insights into the immune pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *It J Gynaecol Obstet.* 2000;3:114-8.

Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in disease. *Clin infect Dis.* 2002;34:204-9.

Witkin SS. Immunological mechanisms in the female genital tract In: Monif GR & Baker DA. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. New York: Pathernon Publishing Group; 2004. p.12.

Wu SF, Chang JS, Wan L, Tsai CH, Tsai FJ. Association of IL1-ra gene polymorphism, but no association of IL-1B and IL-4 gene polymorphism with Kawasaki Disease. *J Clin Lab Anal.* 2005;19:99-102.