

---

## AVALIAÇÃO DE CITOCINAS

---

### EM SECREÇÃO ENDOCERVICAL

---

### DE MULHERES COM CANDIDÍASE,

---

### TRICOMONÍASE OU VAGINITE BACTERIANA

---

Ana Claudia Camargo Campos,<sup>1</sup> Eddie Fernando Candido Murta,<sup>2</sup> Márcia Antoniazzi Michelin,<sup>3</sup> Régis Resende Paulinelli<sup>4</sup> e Cleomenes Reis<sup>1</sup>

#### RESUMO

Os processos infecciosos na vagina devidos a micro-organismos são muito comuns. As vulvovaginites são, em grande parte, causadas por protozoários, leveduras, bactérias e/ou vírus. Sua erradicação ou contenção é normalmente mediada pelas citocinas da mucosa vaginal. O presente estudo teve a intenção de verificar a concentração de citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e suas relações com alguns dos agentes das infecções. Foram incluídas 173 mulheres sexualmente ativas com idade entre 16 e 48 anos, média de  $31,4 \pm 6,5$  anos, as quais foram divididas nos seguintes grupos: controle, com candidíase, com tricomoníase e com vaginite bacteriana. As amostras foram submetidas ao cultivo e, posteriormente, à identificação do micro-organismo. Em seguida, foi feita a dosagem de citocinas da secreção endocervical por meio do teste ELISA. Os dados foram submetidos à análise estatística, calculando-se a mediana e o intervalo interquartil, e ao teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significantes com  $p < 0,05$ . Verificou-se uma maior concentração de diferentes citocinas no trato genital inferior de mulheres com candidíase, tricomoníase, vaginite bacteriana do que naquelas com microbiota normal. No grupo controle, foram incluídas 60 (34,7%) mulheres; nos outros grupos, 19 (11,0%) apresentavam somente candidíase; 3 (1,7%), somente tricomoníase e 10 (5,8%), vaginite bacteriana; as demais apresentaram outras intercorrências como HPV ou vaginose bacteriana, entretanto não foi realizado o estudo destes casos ou da sua associação com os demais grupos. IL-2 e IL-12 mostraram-se significativamente elevadas na presença de candidíase, quando comparadas ao grupo controle, com  $p = 0,01$  e  $p = 0,07$ , respectivamente. As pacientes com vaginite bacteriana também apresentaram níveis expressivamente aumentados com  $p=0,03$  para IL-2 e  $p=0,04$  para IL-12. O TNF- $\alpha$  mostrou-se elevado na presença de tricomoníase,

- 
- 1 Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.
  - 2 Disciplina de Ginecologia e Obstetria, Instituto de Pesquisa em Oncologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG.
  - 3 Disciplina de Imunologia, Instituto de Pesquisa em Oncologia, UFTM, Uberaba, MG.
  - 4 Departamento de Ginecologia e Obstetria, da UFG, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Ana Claudia Camargo Campos, Rua 12 Quadra 58A Lote 1/26 Apto 1104C, Ed. Goyases, Vila Brasília, CEP: 74911-110 Aparecida de Goiânia, GO, Brasil. E-mail: anaucg@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 29/9/2010. Revisto em: 14/3/2011. Aceito em: 11/5/2011.

com  $p = 0,04$ . Os resultados encontrados permitem sugerir que pacientes com diferentes infecções vaginais apresentam alterações na concentração de algumas citocinas.

DESCRITORES: Candidíase. Tricomoníase. Vulvovaginites. Citocinas.

## INTRODUÇÃO

Os estudos epidemiológicos, imunológicos, microbiológicos e clínicos das infecções genitais, sintomáticas ou não, tornaram-se importantes, principalmente por sua elevada incidência e frequente recidiva (Murta et al., 2000). Os processos infecciosos na vagina, devidos a micro-organismos virulentos, são muito comuns e resultam no crescimento profuso destes agentes (Gage et al., 2000; Edwards, 2004). Adad et al. descreveram, em 2001, as vaginoses, candidíases e tricomoníases como responsáveis por 90% dos casos de infecção genital. Estes três micro-organismos apresentam prevalência de 22%, 9% e 2%, respectivamente, em mulheres de 15 a 49 anos de idade atendidas em um programa de saúde da família. A prevalência de vaginites é, em média, de 24%, porém este dado pode variar conforme a população estudada (Barcelos et al., 2008). Os principais micro-organismos relacionados à vaginite são: *Candida* sp, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Staphylococcus* sp (Adad et al., 2001; Barcelos et al., 2008).

A tricomoníase consiste em um intenso corrimento vaginal espumante e amarelo-esverdeado, com irritação e dor vulvar, no períneo e na raiz da coxa, além de dispareunia e disúria, e é causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* (López et al., 2000). Na infecção genital ocasionada por fungos, como *Candida* sp, ocorre uma excessiva proliferação na microbiota vaginal que resulta em colonização e consequente infecção caracterizada por uma secreção vaginal fétida e espessa, com aparência granular e prurido vulvar. A vagina torna-se hiperêmica e a vulva, eritematosa, ocorrendo, muitas vezes, escoriação e dispareunia (Di Bartolomeo et al., 2002). A vaginite é uma condição que envolve inflamação ou infecção da vulva e da parede vaginal. Sua etiologia está associada a causas específicas, como as bactérias aeróbias (vaginite bacteriana), e não específicas, devidas aos irritantes químicos ou a dermatoses (Donders et al., 2002; Syed e Braverman, 2004). A vaginite bacteriana diferencia-se da vaginose bacteriana acentuada, sobretudo porque, durante a avaliação microscópica, a primeira apresenta tipicamente leucócitos e, além disso, a vagina se encontra eritematosa, inflamada e com sintomas de queimação, dor e dispareunia (Donders et al., 2002).

A vagina e a cérvix são as primeiras linhas de defesa física e imunológica contra patógenos sexualmente transmissíveis, mediadas pela imunidade inata e específica (Gage et al., 2000; Lima e Alves, 2008). As fases efetoras da imunidade inata e específica são, de maneira geral, mediadas por estas moléculas proteicas denominadas citocinas. Na imunidade inata, as citocinas são, na sua maior parte, produzidas por fagócitos mononucleares e, na imunidade específica, pelos

linfócitos T ativados, os quais são capazes de provocar reações inflamatórias ricas em neutrófilos que servem para conter e, quando possível, erradicar as infecções microbianas (Machado et al., 2004). As citocinas podem ser denominadas de interleucinas porque várias delas são produzidas por leucócitos e atuam também nestas células. O termo “citocinas” é normalmente usado como nomenclatura padrão (Machado et al., 2004; Rock et al., 2010).

Assim, as citocinas constituem um grupo de proteínas intercelulares produzidas por várias células do sistema imunológico que estão envolvidas na geração e manutenção de uma resposta imune. Elas são induzidas por estímulos específicos e são responsáveis pela diferenciação dos vários tipos celulares, por exemplo as células T, levando a uma complexa rede de atividades imunológicas que atrai células para o sítio da lesão, onde fazem o processo de defesa do hospedeiro (Machado et al., 2004; Rock et al., 2010).

A população de células T CD4<sup>+</sup> (T auxiliares) é heterogênea e, a depender do microambiente, do estímulo e da produção de citocinas, o padrão de resposta imune pode ser dividido em Th1, Th2 e Treg. Estes três padrões são os mais conhecidos, contudo outros têm sido descritos. Essa observação tem contribuído bastante para o entendimento da imunopatogênese da maioria das doenças infecciosas (Machado et al., 2004; Weissenbacher et al., 2010).

A elucidação de como os processos infecciosos e inflamatórios ocorrem na região vaginal pode servir de base para o melhor entendimento da patogênese dessas infecções, portanto foram dosadas algumas citocinas que representassem os diferentes tipos de respostas linfocíticas. As citocinas locais IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são representativas da resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) que estimulam os linfócitos T citotóxicos, os quais são responsáveis pela eliminação de infecções no trato genital (Hildesheim et al., 1999; Machado et al., 2004). Além disso, foram dosadas as citocinas IL-6 e IL-10, pois a primeira apresenta propriedades pró-inflamatórias e a IL-10, características reguladoras (Gravitt et al., 2003; Lima et al., 2008; Zhang et al., 2009). Nesta pesquisa foram feitas as dosagens de citocinas no trato genital inferior de mulheres com candidíase, tricomoníase e vaginite bacteriana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Descrição da população estudada

O trabalho incluiu 173 mulheres entre 16 e 48 anos, média de 31,4 anos  $\pm$  6,5 e mediana de 31 anos, sexualmente ativas, visto que é nesta condição que ocorrem com maior frequência as infecções genitais. Foram excluídas da pesquisa pacientes do sexo feminino que não estivessem na fase reprodutiva; que houvessem feito uso de pomadas vaginais ou duchas intravaginais durante as 24 horas que precederam o dia da coleta; que haviam sido submetidas a conização, cauterização, quimioterapia ou radioterapia ou que não haviam sido atendidas nas Unidades

Básicas de Saúde da cidade de Goiânia. A Tabela 1 caracteriza o grupo de mulheres inseridas nesta pesquisa.

Tabela 1. Caracterização das 173 mulheres inseridas nesta pesquisa

Características	Média ( $\pm$ DP)	Mediana
Menarca (anos)	12,7 $\pm$ 1,6	13
Sexarca (anos)	17,4 $\pm$ 3,4	17
Nº de parceiros nos últimos 5 anos	2,1 $\pm$ 2,7	1
Nº de coitos por semana	2,6 $\pm$ 1,9	3
Paridade	1,8 $\pm$ 1,3	2
Aborto	0,3 $\pm$ 0,5	0
Idade Grupo Controle	32,6 $\pm$ 6,3	33
Idade Grupo Vaginite bacteriana	28,3 $\pm$ 7,5	30
Idade Grupo Candidíase	32,3 $\pm$ 6,0	34
Idade Grupo Tricomoníase	30,4 $\pm$ 4,3	29

DP: desvio-padrão

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEPACCG) e aprovado conforme o Protocolo nº 069/06. O material foi coletado inicialmente no Serviço de Ginecologia e Mama da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) e, posteriormente, em Unidades Básicas de Saúde localizadas em distintas regiões da cidade de Goiânia, no período de abril de 2007 a fevereiro de 2008.

#### Estratificação dos grupos e coleta das amostras

As mulheres foram separadas nos seguintes grupos: com candidíase, com tricomoníase e com vaginite bacteriana. A seleção do grupo controle resultou da observação destas condições: a coloração de Gram demonstrou presença exclusiva de lactobacilos ou sua prevalência, a cultura foi negativa para outros micro-organismos e havia sintomas clínicos compatíveis com a normalidade. O tamanho da amostra foi calculado considerando-se uma prevalência de vulvovaginites de 39% na faixa etária do grupo estudado.

Após as pacientes receberem informações e consentirem em sua inclusão na pesquisa, iniciou-se a coleta de material do fórnice posterior para a cultura dos micro-organismos. Imediatamente, aferiu-se o pH vaginal e procedeu-se à confecção de lâminas para os exames de Papanicolaou e coloração de Gram. As amostras foram coletadas da endocérvice na junção escamo-colunar (JEC) por meio de escova ginecológica introduzida e girada 360° duas vezes. Este material foi utilizado para a dosagem de citocinas (Tavares-Murta et al., 2008). As amostras foram testadas, a fim de se obter o teor de hemoglobina, utilizando-se Hemastix (Baxter Científica). Não foram incluídas as que apresentavam macro-hemoglobina (Gravitt et al., 2003). As amostras de secreção vaginal coletadas das pacientes foram semeadas nos meios de

cultura no laboratório, os quais foram incubados a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 a 72 horas. As lâminas foram submetidas à análise microscópica. Esta avaliação microscópica da secreção vaginal pode auxiliar no diagnóstico, porém o ideal é a confirmação pela cultura microbiológica (Edwards, 2004; Lima e Alves, 2008). Um tubo contendo a secreção endocervical foi centrifugado e o volume do tubo foi medido precisamente. Adicionou-se ao volume inicial 0,85% de salina para obter um volume final de 500 $\mu\text{l}$  de solução que, posteriormente, foi aliquoteado e estocado em *freezer* a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Análise clínica e microbiológica das amostras de secreção vaginal

O material com diagnóstico clínico das vulvovaginites foi caracterizado pela queixa de pelo menos um dos sintomas: prurido vulvar, dispareunia, disúria externa, ardência vaginal, hiperemia vulvar, fissuras vulvares, hiperemia vaginal ou a presença de uma secreção vaginal abundante, com odor fétido (Silva et al., 2001; Donders et al., 2002; Rosa e Rumel, 2004).

O material coletado do fórnice posterior era semeado nos seguintes meios: ágar-base enriquecido com sangue de carneiro a 5%, ágar manitol salgado e ágar MacConkey, incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas. As colônias foram submetidas a esfregaços em solução salina, em lâminas, e em seguida, à coloração de Gram antes dos testes de identificação. Após o crescimento e isolamento da colônia, realizaram-se as provas bioquímicas e enzimáticas para os bastonetes Gram negativos (BGN) desenvolvidos em ágar MacConkey: tríplex açúcar ferro, fermentação de glicose, lactose, sacarose e manitol, produção de indol, motilidade, crescimento em citrato de Simmons, produção de urease, desaminação da fenilalanina, descarboxilases (lisina, ornitina e arginina), produção de vermelho de metila (VM) e prova de Voges-Poskauer (VP) (Koneman et al., 2008).

Para a identificação de cocos Gram positivos (CGP), foram utilizadas as seguintes provas: catalase, hemólise em superfície e profundidade no ágar sangue de carneiro a 5%, coagulase, observação da sensibilidade com discos de bacitracina, novobiocina e optoquina, redução de nitrato, VP, citrato de Simmons, fermentação de manitol, glicose, manose, sacarose e frutose, oxidase e ornitina descarboxilase (Koneman et al., 2008).

O isolamento de leveduras nas amostras de secreção vaginal foi realizado em ágar Sabouraud, sendo as amostras incubadas em temperatura ambiente por 24h a 48h. As colônias características foram submetidas a testes de identificação por meio da formação de tubo germinativo em soro fetal bovino, produção de clamidoconídios em ágar corn-mealacrescido de tween 80 e provas de assimilação de carboidratos como: glicose, lactose, galactose, rafinose, celobiose e trealose (Kurtzman e Fell, 1999; Sidrim e Rocha, 2004; Favalessa et al., 2010).

O isolamento e a identificação de *Trichomonas vaginalis* foram realizados ao se observar, por microscopia a fresco, um micro-organismo unicelular de formato ovoide ou arredondado, com citoplasma pálido ou acinzentado, flagelado, podendo

apresentar grânulos no seu centro e uma forma vesicular (Di Bartolomeo et al., 2002; Camargo-Campos et al., 2008).

#### Dosagem de citocinas das amostras da região endocervical

As citocinas presentes na secreção endocervical coletadas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram dosadas pelo teste ELISA utilizando-se *kits* específicos BD Opteia®. A especificidade das citocinas estudadas foi de 10ng/mL, exceto o TNF- $\alpha$  que foi de 100ng/ml. A sensibilidade de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi de, respectivamente, 1000 - 15,6 pg/ml, 300-4.7 pg/ml, 500 - 7,8 pg/ml, 2000 - 31,3 pg/ml, 300 - 4,7 pg/ml and 500 - 7,8 pg/ml. O teste ELISA para as amostras e controles foi realizado em duplicata no Laboratório IPON/UFTM. Foram utilizadas citocinas-padrão recombinantes e a secreção endocervical. As amostras previamente diluídas em salina foram novamente submetidas a diluições seriadas 1:2 em solução salina tamponada com tampão diluente de PBS com soro bovino fetal (*assay diluent*), com base nas concentrações iniciais diluídas, seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada calculando-se a diferença entre as absorbâncias conseguidas a 405nm e 490nm e multiplicadas pelo fator da diluição advindo de uma diluição inicial das amostras em salina.

A concentração de citocinas na secreção endocervical foi determinada em pg/ml, comparando-se as absorbâncias obtidas em uma curva-padrão da respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente (Maisuradze et al., 2005). Por este estudo não foi possível minimizar as variações de concentração de citocinas em diferentes fases do ciclo menstrual, pois as amostras foram coletadas em diferentes fases desse ciclo.

A análise estatística descritiva incluiu distribuições de frequência de dados categóricos. Foram comparadas as medianas e os intervalos interquartis das interleucinas pelo teste de Mann-Whitney, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ . Foi utilizado o pacote estatístico SPSS versão 15.0.

## RESULTADOS

Entre as 173 mulheres participantes do estudo, 60 (34,7%) foram incluídas no grupo controle. Entre as que apresentavam intercorrências, 19 (11,0%) apresentavam somente candidíase; 3 (1,7%), somente tricomoníase e 10 (5,8%), vaginite bacteriana. As demais infecções por HPV e vaginose bacteriana (VB) somam 71 (41,0%), mas não foram incluídas na avaliação de citocinas. Entre as portadoras de candidíase, quatro (2,3%) também mostraram infecção pelo HPV concomitantemente. Entre aquelas com tricomoníase, duas (1,1%) estavam infectadas por HPV e dentre as portadoras de vaginite bacteriana, quatro (2,3%) também tinham infecção pelo vírus. Em razão do reduzido tamanho dos grupos com infecções concomitantes, não foi possível analisá-los estatisticamente.

Nas amostras coletadas, foram identificados os seguintes micro-organismos: *Candida albicans*, 23 casos (13,3%); *C. glabrata*, 5 (2,9%); *C. parapsilosis*, 3 (1,7%) e *C. krusei*, 1 (0,6%). Os estafilococos reconhecidos pela cultura em todas as mulheres examinadas foram: *S. aureus*, 32 casos (18,5%); *S. xylosus* e *S. cohnii*, ambos com 22 casos (12,7%); *S. haemolyticus*, 17 (9,8%); *S. schleiferi*, 9 (5,2%); *S. lugdunensis*, 7 (4,0%); *S. warneri*, 6 (3,5%); *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, cada um deles apresentou 5 casos (2,9%); *S. pulvereri*, 3 (1,7%) e *S. delphini*, 1 caso (0,6%), sendo estes potenciais causadores de vulvovaginites.

Entre as enterobactérias identificadas, destacam-se: *Escherichia coli*, 25 casos (14,4%); *Edwardsiella tarda*, 4 (2,3%); *Klebsiella oxytoca*, 2 (1,1%); *Edwardsiella gergoviae*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*, todas com 1 caso (0,6%). Entre as mulheres com candidíase, somente oito (4,6%) apresentaram BGN p=0,39 e uma, BGN e VB (0,6%) associados p=0,47 e cinco (2,9%) apresentaram *Trichomonas vaginalis*.

As citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram dosadas e as suas concentrações comparadas – grupo controle e demais grupos. Somente os níveis de IL-2 e IL-12 mostraram-se significativamente elevados na presença de candidíase e vaginite bacteriana, em comparação com o grupo controle; já em mulheres com presença exclusiva de tricomoníase, o TNF- $\alpha$  apresentou concentração elevada em relação ao controle, demonstrando também diferença estatisticamente significativa. No entanto, as IL-6 e IL-10 não apresentaram diferença significativa em nenhum dos casos infecciosos quando comparados ao grupo controle. Os dados dessas concentrações encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4 a seguir.

**Tabela 2.** Comparação da concentração de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  da via Th1, em mulheres com candidíase, tricomoníase ou vaginite bacteriana e o grupo controle

Citocinas /n [ ] pg/ml	IFN- $\gamma$			TNF- $\alpha$		
	Mediana	II 25-75%	p	Mediana	II 25-75%	p
Grupo Controle=60	22,30	4,07-53,88	-	38530	19270-84160	-
Total com Candidíase=23	11,07	0,41-79,92	0,33	36420	19620-75640	0,97
Somente Candidíase=19	11,99	0,49-87,05	0,62	35190	19300-57810	0,65
Total com VB=14	19,25	7,68-42,35	0,97	33190	23140-50740	0,85
Somente VB=10	17,88	7,68-42,35	0,92	32900	23140-50740	0,72
Total com Tricomoníase=05	12,25	0,62-19,73	0,16	57370	39760-196900	0,09
Somente Tricomoníase=03	12,25	0,75-22,15	0,19	68620	46130-196900	0,04*

II = Intervalo Interquartil; VB = vaginite bacteriana; \* resultados estatisticamente significativos;  $\alpha$ =5%.

**Tabela 3.** Comparação da concentração IL-2 e IL-12 da via Th1, em mulheres com candidíase, tricomoníase ou vaginite bacteriana e o grupo controle

Citocinas /n [] pg/ml	IL-2			IL-12		
	Mediana	II 25-75%	p	Mediana	II 25-75%	p
Grupo Controle=60	20,64	5,43-67,41	-	44,30	27,71-113,1	-
Total com Candidíase=23	50,60	32,40-70,15	0,01*	78,48	48,78-219,4	0,07
Somente Candidíase=19	54,82	38,80-74,54	0,01*	90,51	50,28-236,2	0,07
Total com VB=14	67,94	30,17-97,63	0,04*	92,34	65,93-163,5	0,02*
Somente VB=10	79,73	29,83-120,1	0,03*	104,1	57,30-228,5	0,04*
Total com Tricomoníase=05	14,48	6,79-104,1	0,86	73,35	50,87-134,1	0,30
Somente Tricomoníase=03	14,48	8,48-83,45	0,56	111,6	40,25-183,1	0,16

II = Intervalo Interquartil; VB=Vaginite bacteriana; \* resultados estatisticamente significativos;  $\alpha=5\%$ .

**Tabela 4.** Comparação da concentração de IL-6 e IL-10 em mulheres com candidíase, tricomoníase ou vaginite bacteriana e o grupo controle

Citocinas /n [] pg/ml	IL-6			IL-10		
	Mediana	II 25-75%	p	Mediana	II 25-75%	p
Grupo Controle=60	574800	156200-1183000	-	88230	47960-220500	-
Total com Candidíase=23	1046000	294400- 1409000	0,19	76880	50130- 197200	0,96
Somente Candidíase=19	805300	294400- 1435000	0,27	68660	50130- 197200	0,92
Total com VB=14	314000	93020- 757200	0,28	111000	43780- 241000	0,89
Somente VB=10	161300	93020- 599500	0,13	66120	36720- 136900	0,29
Total com Tricomoníase=05	384200	149900- 1173000	0,88	107000	97810- 134000	0,75
Somente Tricomoníase=03	245300	54500- 962500	0,38	107000	102500-141000	0,69

II = Intervalo Interquartil; VB=Vaginite bacteriana;  $\alpha=5\%$ .

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o perfil de citocinas em amostras endocervicais de mulheres sexualmente ativas, atendidas em postos de saúde da cidade de Goiânia e que apresentassem ou não infecções genitais. Nesta amostragem foi encontrada uma alta incidência de VB, HPV e tricomoníase, se comparada a estudo anterior relatado por Camargo-Campos et al. (2008), o que demonstra a necessidade de campanhas educativas sobre o comportamento sexual, direcionadas a mulheres com parceiros estáveis ou não (Barcelos et al., 2008). Além destes processos patológicos, há um consenso na literatura que *Candida albicans* é o agente etiológico mais comum das vaginites micóticas, ocorrendo em 80,0% a 95,0% dos casos (Carvalho et al., 2003; Rosa e Rumel, 2004). Esse dado condiz com os resultados desta pesquisa, embora tenha sido observada a incidência de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e outras, responsáveis pelos demais casos de infecção fúngica vulvovaginal. Neste estudo não foi possível realizar a análise estatística dos grupos que apresentavam infecções concomitantes com o HPV ou VB em virtude do tamanho restrito da amostra. Porém, Murta et al. (2000) relatam uma possível associação entre infecções pelo HPV e a presença de candidíase, mesmo na presença de células ou mediadores químicos de defesa imunológica.



Alguns mediadores envolvidos na defesa imune dos seres humanos já são conhecidos, no entanto há um contínuo estudo das suas relações. Assim, nesta pesquisa, procurou-se avaliar as respostas por meio da ação de mediadores conhecidos como citocinas locais IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no trato genital inferior. Segundo Mills e McGuirk (2004) e Weissenbacher et al. (2010), a resposta Th1 regida por linfócito T citotóxicos está relacionada à defesa contra protozoários, fungos, bactérias intracelulares e vírus.

Neste estudo, a citocina IL-12 (Th1) mostrou-se elevada em pacientes com candidíase, o que, segundo a literatura, seria uma condição favorável à melhora do processo infeccioso (Witkin et al., 2000). De acordo com outro estudo, o aumento da concentração de citocinas da via Th2, em casos de candidíase com diminuição de IFN- $\gamma$  (Th1) (Ouyang et al., 2008), e a elevação de IL-10 (Treg) estão em concordância com o aumento da incidência de *Candida albicans* e sua conversão da forma de levedura para a de hifas invasivas, que são reguladas pelo sistema imune celular ou via Th1 e a inibição dessa via determina o aumento da proliferação fúngica. Machado et al. (2004) também descreveram que o aumento de infecções genitais está relacionado com a frequência maior de coitos e, conseqüentemente, de sêmen, o que promove uma inibição da resposta Th1 com diminuição de IL-12 e IFN- $\gamma$ , provavelmente indicando a continuidade do processo infeccioso nessas pacientes.

Nas vaginites bacterianas, a bactéria *E. coli* foi a mais frequente causadora desta intercorrência, fato também relatado por Donders et al. (2002) que também demonstrou uma inter-relação entre a presença de vaginite bacteriana e o achado de estreptococos do grupo B, *S. aureus* e *E. coli*. Estes patógenos inibem a proliferação de *Lactobacillus sp* e de *Gardnerella vaginalis*. Alguns autores afirmam que a presença destas bactérias está diretamente envolvida com o aumento de citocinas da via Th1, como a IL-1, quando se compara com grupos sem infecções genitais (Donders et al., 2002; Scott et al., 2005).

Nesta pesquisa, foi também evidenciado o aumento significativo de citocinas da via Th1 em casos de vaginite bacteriana, como a IL-2 e IL-12, o que demonstra a ação de uma resposta celular nestes processos infecciosos. Esse dado condiz com os achados de Scott et al. (2005) que relatam aumentos de IL-12 e IFN- $\gamma$  nestas intercorrências devidos a *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* e *S. aureus*. Porém, neste estudo, a concentração de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, fato possivelmente explicado pelo número reduzido de amostras no grupo em questão.

Sabe-se que o *T. vaginalis* promove citoaderência com produção de citotoxinas em cultura de células (Lopez et al., 2000). Este efeito citotóxico poderia levar a um processo inflamatório ocasionado pelo protozoário e predisporia às infecções pelo HIV e VB por causa da diminuição da via Th1 que também medeia a resposta a infecções virais e a VB (Syed e Braverman 2004). No entanto, Scott et al. (2005) indicam elevações de IL-10 em casos de tricomoníase, fato não observado por Han et al. (2009) quando descrevem aumentos representativos das citocinas

IL-1 e TNF- $\alpha$  produzidas em macrófagos, via óxido nítrico, pela ativação do NF- $\kappa$ B, responsável pelo recrutamento de macrófagos ao local do processo inflamatório. Essa situação também foi observada nesta pesquisa, com aumentos significativos de TNF- $\alpha$  nesta intercorrência e presença maciça de macrófagos verificada no exame a fresco e pela citologia oncótica. No entanto, Malla et al. (2007) relataram também aumentos significativos de IL-2 e IFN- $\gamma$  em mulheres sintomáticas, situação não observada em nosso estudo, possivelmente porque o estudo anterior comparou mulheres sintomáticas e não sintomáticas. Neste trabalho, observou-se apenas a presença do protozoário nos exames laboratoriais, comparando-se a concentração de citocinas nas mulheres infectadas e no grupo controle.

Verificados os níveis de citocinas locais em mulheres com candidíase, tricomoníase e vaginite bacteriana, não foi possível descrever a associação destas doenças com os demais processos infecciosos em razão do reduzido tamanho da amostra estudada quando estes estavam concomitantemente associados. Observou-se que a resposta imunológica pela via Th1 com produção de IL-2 e IL-12 encontrava-se elevada na presença de candidíase e vaginite bacteriana e os níveis de TNF- $\alpha$  estavam aumentados em casos de tricomoníase. Isso sugere que existe, provavelmente, uma resposta imunológica similar entre estes processos infecciosos, fato ainda não relatado em pesquisas anteriores nas quais não foram comparados os perfis de várias citocinas das vias Th1, Th2 e Treg entre três frequentes tipos de infecção genital em mulheres com microbiota autóctone.

O entendimento dos mecanismos imunes relacionados aos processos infecciosos e inflamatórios que ocorrem na região vaginal pode servir como base para uma melhor compreensão da patogênese dessas infecções e, possivelmente, para auxiliar em futuros tratamentos imunoterápicos ou em imunodignósticos. Com estes dados, poderíamos também entender melhor a correlação entre a microbiota e o desenvolvimento das infecções e inferirmos possíveis métodos de prevenção.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Financiamento: FAPEMIG (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico)

#### ABSTRACT

Evaluation of cytokines in endocervical secretions of women with candidiasis, trichomoniasis or bacterial vaginitis.

Infectious processes in the vagina due to infectious micro-organisms are very common. Vulvovaginitis is commonly caused by protozoa, yeasts, bacteria and/or viruses and their eradication or containment are usually mediated by cytokines of the vaginal mucosa. In this study, the intention was to measure the concentration

of cytokines IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and their relationship with some of the infections. One-hundred and seventy three women were included, with ages between 16 and 48 years (mean=31.4  $\pm$  6.5 years). They were distributed into four groups: control, candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginitis group. The samples were subsequently submitted to culture and identification of micro-organism, followed by cytokine measurements. The data was submitted to statistical analysis. Median, interquartile range and the Mann-Whitney test was employed and considered significant when  $p < 0.05$ . The levels of cytokines in the lower genital-tract of women with candidiasis, trichomoniasis, bacterial vaginitis were higher than those with normal flora. Sixty (34.7%) women were in the control group, 19 (11.0%) presented only candidiasis, three (1.7%) presented trichomoniasis, and only ten presented (5.8%) bacterial vaginosis. The remaining participants had comorbidities such as HPV or bacterial vaginosis, although the study of these last two or association with other conditions was not performed. IL-2 and IL-12 were significantly elevated in the presence of candidiasis, compared with the control group  $p = 0.01$  and  $p = 0.07$ , respectively. Patients with bacterial vaginitis also had statistically significant increased levels for IL-2 ( $p = 0.03$ ) and for IL-12 ( $p = 0.04$ ). TNF- $\alpha$  was elevated only in the presence of trichomoniasis  $p = 0.04$ . We concluded that patients with vaginal infections had an increase in the concentrations of some cytokines.

**KEY WORDS:** Candidiasis. Trichomoniasis. Vulvovaginitis Cytokines.

## REFERÊNCIAS

1. Adad SJ, de Lima RV, Sawan ZT, Silva ML, de Souza MA, Saldanha JC, Falco Aguiar VA, Cunha AH, Murta EFC. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J* 119: 200-205, 2001.
2. Barcelos MRB, Vargas PRM, Baroni C, Miranda AE. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30: 349-354, 2008.
3. Camargo-Campos AC, Freitas-Junior R, Ribeiro LFJ, Paulinelli RR, Reis C. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. *Sao Paulo Med J* 126: 333-336, 2008.
4. Carvalho RJV, Cunha CM, Silva DAO, Sopelete MC, Urzedo JE, Moreira TA, Moraes PSA, Taketomi EA. IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. *Rev Assoc Med Bras* 49: 434-438, 2003.
5. Di Bartolomeo S, Rodriguez FM, Sauka DH, Alberto TR. Prevalencia de microorganismos asociados a secrecion genital femenina, Argentina. *Rev Saude Publica*. 36: 545-552, 2002.
6. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 109: 34-43, 2002.
7. Edwards L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatol Ther* 17: 102-110, 2004.
8. Favalessa OCi, Martins MA, Hahn RC. Aspectos micológicos e susceptibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 673-677, 2010.
9. Gage JR, Sandhu AK, Nihira M, Bonecini-Almeida M da G, Cristoforoni P, Kishimoto T, Montz FJ, Martinez-Maza O. Effects of human papillomavirus -associated cells on human immunodeficiency virus gene expression. *Obstet Gynecol* 96: 879-885, 2000.

10. Gravitt PE, Hildesheim A, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Morera LA, Cardenas F, Bowman FP, Shah KV, Crowley-Nowick PA. Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. *J Clin Immunol* 23: 175-183, 2003.
11. Han IH, Goo SW, Park SJ, Hwang SJ, KimYS, Yang MS, Ahn MH, Ryu JS. Proinflammatory Cytokine and Nitric Oxide Production by Human Macrophages Stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* 47: 205-212, 2009.
12. Hildesheim A, McShane LM, Schiffman M, Bratti MC, Rodriguez AC, Herrero R, Morera LA, Cardenas F, Saxon L, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. Cytokine and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: reproducibility of the Weck-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J Immunol Methods* 225: 131-143, 1999.
13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schrelenberger PC, Winn-Jr WC. *Diagnóstico Microbiológico*. Editora MEDSI. Rio de Janeiro, 2008. p.220-224.
14. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier. Netherlands, 1999. p.918-926.
15. Lima YAR, Alves MFC. O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Rev Patol Trop* 37: 295-309, 2008.
16. López LB, Braga MB, López JO, Arroyo R, Costa e Silva Filho F. Strategies by which some pathogenic-trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *An Acad Bras Cienc* 72: 173-186, 2000.
17. Machado PRL, Araújo IASA, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol* 79: 647-664, 2004.
18. Malla N, Yadav M, Gupta I. Kinetics of serum and local cytokine profile in experimental intravaginal trichomoniasis induced with *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic women. *Parasite Immunol* 29: 101-105, 2007.
19. Maisuradze NZ, Sanikidze TV, Topuria MD, Museridze NG. Oxidative processes in the cervical and vaginal epithelial tissue in patients with HPV infection. *Georgian Med News* 120: 30-33, 2005.
20. Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol* 16: 107-117, 2004.
21. Murta EFC, Souza MAH, Araújo Jr E, Adad SJ: Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological. *Sao Paulo Med J* 118: 105-108, 2000.
22. Ouyang W, Chen S, Liu Z, Wu Y, Li J. Local Th1/Th2 cytokine expression in experimental murine vaginal candidiasis. *J Huazhong Univ Sci Technolog [Med Sci]* 28: 352-355, 2008.
23. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H: The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28: 321-342, 2010.
24. Rosa MI, Rumel D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet* 26: 65-70, 2004.
25. Scott K, Manunta M, Germain C, Smith P, Jones M, Mitchell P, Dessi D, Bamford KB, Lechler RI, Fiori PL, Foster GR, Lombardi G. Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology* 116: 245-254, 2005.
26. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Diagnóstico laboratorial das leveduras*. In Sidrim JJC, Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004. p. 76-88.
27. Silva WM, Miranda CRR, Freitas MJC, Pessoa ARS, Lauand A, Lima RM. Vaginose bacteriana em mulheres com infertilidade e em menopausadas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 23: 641-646, 2001.
28. Syed TS, Braverman PK. Vaginitis in adolescents. *Adolesc Med Clin* 15: 235-251, 2004.
29. Tavares-Murta BM, de Resende AD, Cunha FQ, Murta EF. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138: 93-99, 2008.
30. Weissenbacher T, Walter C, Mylonas I, Scholz C, Gingelmaier A, Friese K. Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 281: 77-80, 2010.
31. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 183: 252-256, 2000.
32. Zhang D, Liu ZH, Liao QP, Ma JM, Sun YF, Fan SR, Hu LN, Jia HJ, Di W, Wang W: Study of local immunity of lower genital tract infections. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 44: 13-15, 2009.