

JOSÉ QUEIROZ FILHO¹
ANA KATHERINE GONÇALVES¹
GERALDO BARROSO CAVALCANTE JÚNIOR¹
DALIANA CALDAS PESSOA²
JOSÉ ELEUTÉRIO JÚNIOR³
PAULO CÉSAR GIRALDO⁴
VALÉRIA SORAYA DE FARIAS SALES¹

Eosinofilia no sangue periférico de mulheres com candidíase vaginal recorrente

Eosinophilia in peripheral blood of women with recurrent vaginal candidiasis

Artigo Original

Palavras-chave

Eosinofilia/imunologia
Imunoglobulina E
Candidíase vulvovaginal/imunologia
Mulheres

Keywords

Eosinophilia/immunology
Immunoglobulin E
Candidiasis, vulvovaginal
Vulvovaginitis
Women

Resumo

OBJETIVO: Quantificar o número de células de defesa e os níveis de imunoglobulina E (IgE) no sangue periférico em amostra de mulheres com candidíase vaginal recorrente. **MÉTODOS:** Estudo de corte transversal com 60 mulheres, 40 com candidíase vulvovaginal e 20 do grupo controle (sem doença). As células de defesa foram identificadas utilizando um sistema de impedância combinada com a citometria de fluxo, os níveis de IgE total e específica foram medidos por meio de técnicas de quimiluminescência, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis nominais e do teste de Spearman para correlações das concentrações de IgE e de eosinófilos no sangue periférico. **RESULTADOS:** O número de eosinófilos no sangue periférico de pacientes com candidíase vulvovaginal, 302,60 ($\pm 253,07$), foi significativamente maior do que o grupo controle, 175,75 ($\pm 109,24$) ($p=0,037$). Os níveis séricos de IgE total e específica foram semelhantes em ambos os grupos de mulheres com e sem candidíase vulvovaginal recorrente ($p=0,361$). Entretanto, observou-se uma correlação positiva moderada entre eosinofilia e níveis de IgE total no sangue periférico de mulheres com candidíase vaginal recorrente ($r=0,25$). **CONCLUSÃO:** Mulheres com candidíase vaginal recorrente parecem ter maior concentração de eosinófilos no sangue periférico que as assintomáticas.

Abstract

PURPOSE: To quantify the number of defense cells and immunoglobulin E (IgE) levels in peripheral blood sampled from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted on 60 women, 40 with vulvovaginal candidiasis and 20 controls. The defense cells were identified using an impedance system combined with flow cytometry and total and specific IgE was measured by chemiluminescence. The Mann-Whitney test was used for nominal variables and the Spearman test was used to determine the correlation of IgE concentration and eosinophils in peripheral blood. **RESULTS:** The number of eosinophils in peripheral blood from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis, 302.60 (± 253.07), was significantly higher compared to control, 175.75 (± 109.24) ($p=0.037$). Serum levels of total and specific IgE were similar in the groups of women with and without recurrent vulvovaginal candidiasis ($p=0.361$). However, there was a moderate positive correlation between eosinophils and total serum IgE in the candidiasis group ($r=0.25$). **CONCLUSION:** Women with recurrent vulvovaginal candidiasis are more likely to have eosinophils in peripheral blood.

Correspondência

José Queiroz Filho
PPGCSa
Avenida Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n
CEP: 59010-180
Natal (RN), Brasil

Recebido

10/07/2013

Aceito com modificações

04/10/2013

Trabalho realizado no programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal (RN), Brasil.

¹Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal (RN), Brasil.

²Universidade Potiguar – UNP – Natal (RN), Brasil.

³Departamento Materno-infantil, Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza (CE), Brasil.

⁴Departamento de Tocoginecologia, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – Campinas (SP), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais frequentes nos ambulatórios de ginecologia, afetando 75% de todas as mulheres pelo menos uma vez durante suas vidas — menos de 5% terão candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR). A CVVR é uma situação que traz grande desconforto para a mulher, podendo até mesmo cursar com transtornos psicológicos¹⁻⁴. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em vaginas de pacientes sintomáticas. São micro-organismos oportunistas que, em certas condições, como maior virulência do fungo ou desequilíbrio da imunidade do hospedeiro, podem tornar-se patogênicos⁵⁻⁷. A resposta imune adaptativa é responsável pela proteção das mulheres contra a conversão do organismo para um agente patogênico oportunista da mucosa vaginal⁸⁻¹¹.

A *candida* é um fungo comensal do trato gastrointestinal e geniturinário, e como resultado dessa exposição a maioria, se não todos os indivíduos saudáveis, desenvolvem imunidade específica adaptativa a *candida* demonstrada por meio de anticorpos séricos na mucosa, “*in vitro*” ou por meio do teste de reatividade cutânea retardada por respostas de células T⁸⁻¹¹. A imunidade celular (IMC) é o centro de todas as hipóteses para explicar candidíase de mucosas. A defesa do hospedeiro contra a candidíase envolve equilíbrio entre resposta imune celular do hospedeiro e o patógeno em questão (Th1 e Th2)^{9,11,12}.

A resistência das mucosas do hospedeiro às infecções por *candida* está associada à predominância da resposta imune do tipo celular (resposta das células T CD4), enquanto que a susceptibilidade à infecção está associada à resposta do tipo humoral (resposta das células B)^{9,12}.

Muitos casos de candidíase vulvovaginal recorrente CVVR são atribuídos à resistência terapêutica, no entanto, outra hipótese amplamente aceita é que a CVV primária é uma reação alérgica causada por imunoglobulina E *candida* específico (IgE)^{9,12,13}. Durante a exposição ao antígeno, na falta de resposta celular específica, ocorre predominantemente uma resposta humoral com aumento da produção de anticorpos IgE a partir de linfócitos presentes na membrana basal. A presença de alérgenos no canal vaginal e o transporte intraepitelial favoreceriam a produção de IgE específica, que, por sua vez, induziria a degranulação dos mastócitos provocando a liberação de mediadores vasoativos como histamina e mediadores inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos), culminando em episódios recorrentes de candidíase¹⁴.

A resposta vaginal de hipersensibilidade mediada por IgE a *candida albicans* pode ser um cofator para CVVR em mulheres em risco. A liberação de histamina e prostaglandina E2 induz uma resposta inflamatória localizada e imunossupressão que favorece a proliferação de *candida albicans*. Confirmando essa teoria, um estudo interessante demonstrou que pacientes com CVVR apresentavam IgE no conteúdo vaginal, sugerindo uma resposta de hipersensibilidade localizada¹⁵.

O objetivo deste estudo foi quantificar o número de células de defesa (neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos) presentes no sangue periférico de mulheres com CVVR e correlacionar com os níveis de IgE total e específica no sangue periférico.

Métodos

Seleção dos sujeitos

Foram incluídas neste estudo 60 mulheres atendidas por demanda espontânea em um ambulatório público no período de fevereiro a abril de 2009, sendo as 40 mulheres que apresentavam 3 ou mais episódios de candidíase vaginal no ano diagnosticadas por cultura positiva para *candida* consideradas como grupo em estudo e 20 mulheres assintomáticas classificadas como grupo controle. Como critérios de exclusão, não foram consideradas elegíveis mulheres portadoras de doenças crônico-degenerativas, que faziam uso de medicamentos imunossupressores e antibióticos, grávidas, portadoras de doenças sexualmente transmissíveis, pacientes que praticaram atividade sexual e tenham utilizado duchas ginecológicas nas últimas 48 horas, estivessem em período menstrual e/ou fossem imunodeprimidas. Após anamnese os objetivos do estudo foram apresentados às mulheres, tendo sido incluídas apenas aquelas que aceitaram participar e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Potiguar.

As secreções vaginais foram coletadas no momento da consulta, com *swab* de alginete estéril. Em seguida, foram acondicionadas em tubo contendo solução salina estéril 0,85% e enviadas para o laboratório de microbiologia para posterior avaliação. As amostras de sangue (10 mL) foram obtidas de punção de sangue periférico venoso por sistema a vácuo (Becton – Dickinson – Vacutainer SST BD). Em resumo, tubos contendo anticoagulantes foram utilizados para acondicionar 4 mL de sangue, o qual foi utilizado para quantificar as células de defesa, e em tubos contendo gel separador sem anticoagulante (Becton – Dickinson – vacutainer SST BD) foi acondicionado 6 mL de sangue periférico, que foi submetido

a processo de coagulação em temperatura ambiente e posteriormente submetido a centrifugação a 3000 Xz para obtenção de soro e realização da quantificação dos níveis de IgE sérica total e específica para *Candida albicans*.

As secreções vaginais colhidas foram semeadas em Agar de Saboraud dextrose 4% (DIFCO) contendo clorafenicol (Sigma – Aldrich) (0,15 g/L). As amostras processadas e incubadas a 37°C por 72 horas. A interpretação das culturas foi baseada no seguinte ponto de corte: sem nenhum crescimento detectável ou até quatro colônias, era considerado negativo; acima de quatro colônias, era considerado positivo. Esse critério de avaliação foi baseado em resultados de culturas de pacientes assintomáticas levando-se em consideração que a *Candida* é um micro-organismo comensal que faz parte da microbiota humana. Como método de triagem foi utilizado a bacterioscopia por Gram.

As leveduras isoladas foram identificadas de acordo com a metodologia clássica: por técnica de microcultivo e provas bioquímicas e fisiológicas, como assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de fontes de nitrogênio.

A contagem foi realizada em duplicatas por contador hematológico automatizado CELL DYN 3500 (Abbott Laboratories), que utiliza um sistema de impedância combinado com citometria de fluxo. A contagem diferencial de células de defesa foi revisada em esfregaço sanguíneo, no qual foi colocado 10 µl de sangue em lâmina de vidro com borda fosca e previamente identificada, sendo posteriormente realizada a distensão sanguínea. Em seguida, foi corada com corante Leishman (Merck do Brasil) e, após lavagem e secagem, a leitura foi realizada em microscopia óptica com a objetiva de imersão (X100).

Os níveis séricos de IgE total foram determinados pelo método de quimiluminescência, em aparelho Immulite 2000/ DPC MEDLAB – USA, usando o *kit* Immulite 2000/DPC MEDLAB – USA e seguindo-se todas as recomendações do fabricante. Os resultados foram emitidos conforme a emissão de luz interrompida que foi proporcional à concentração de IgE da amostra e expressos em UI/mL. As concentrações de IgE total foram obtidas por comparação das dosagens dos casos com os valores de uma curva de calibração com padrões de concentrações conhecidas.

Os níveis séricos de IgE específica foram determinados utilizando o método de Fluoroimunoensaio, usando o *kit* UniCAP (Pharmacia & Upjohn) para IgE específica anti-C. Albicans, seguindo-se todas as recomendações do fabricante.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SPSS versão 10.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis nominais e do teste de Spearman para correlações da concentração de IgE e de eosinófilos no sangue periférico. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008.

Resultados

O número de eosinófilos no sangue periférico de pacientes com CVV, 302,60 ($\pm 253,07$), foi significativamente maior do que o do grupo controle, 175,75 ($\pm 109,24$) ($p = 0,037$). Neutrófilos, linfócitos e macrófagos também foram quantificados, mas não apresentam diferenças significativas (Tabela 1).

Correlacionando-se à contagem de eosinófilos no sangue periférico com as concentrações de IgE total sérica, foi encontrado uma associação positiva moderada ($r = 0,25$) no grupo de pacientes portadoras de CVV, o que não foi observado no grupo controle ($r = 0,0069$) (Tabela 2).

Os níveis séricos de IgE total e específica foram semelhantes em ambos os grupos de mulheres com e sem CVV ($p = 0,361$). Entretanto, observou-se uma correlação positiva entre eosinofilia e níveis de IgE total no sangue periférico de mulheres com CVV (Figura 1).

Tabela 1. Contagem automatizada das células de defesa no sangue periférico de mulheres com e sem candidíase vulvovaginal recorrente

Células	CVV	Controles	Valor p
Neutrófilos	3637,40 \pm 1146,77	3605,60 \pm 1208,77	0,1
Linfócitos	2551,95 \pm 1145,33	2680,90 \pm 1106,76	0,4
Eosinófilos	302,60 \pm 253,07	175,75 \pm 109,24	0,03
Macrófagos	308,00 \pm 138,83	290,70 \pm 170,39	0,5

CVV: candidíase vulvovaginal recorrente.

Tabela 2. Correlação entre IgE total sérica e eosinófilos no sangue periférico em mulheres com candidíase vulvovaginal e grupo controle

	Eosinófilos	IgE total sérica	IgE específica sérica	Razão de risco
CVV	302,60(\pm 253,07)	308,83(\pm 558,94)	<0,10	3,4
Controle	175,75(\pm 109,24)	117,34(\pm 82,66)	<0,10	0,6

CVV: candidíase vulvovaginal.

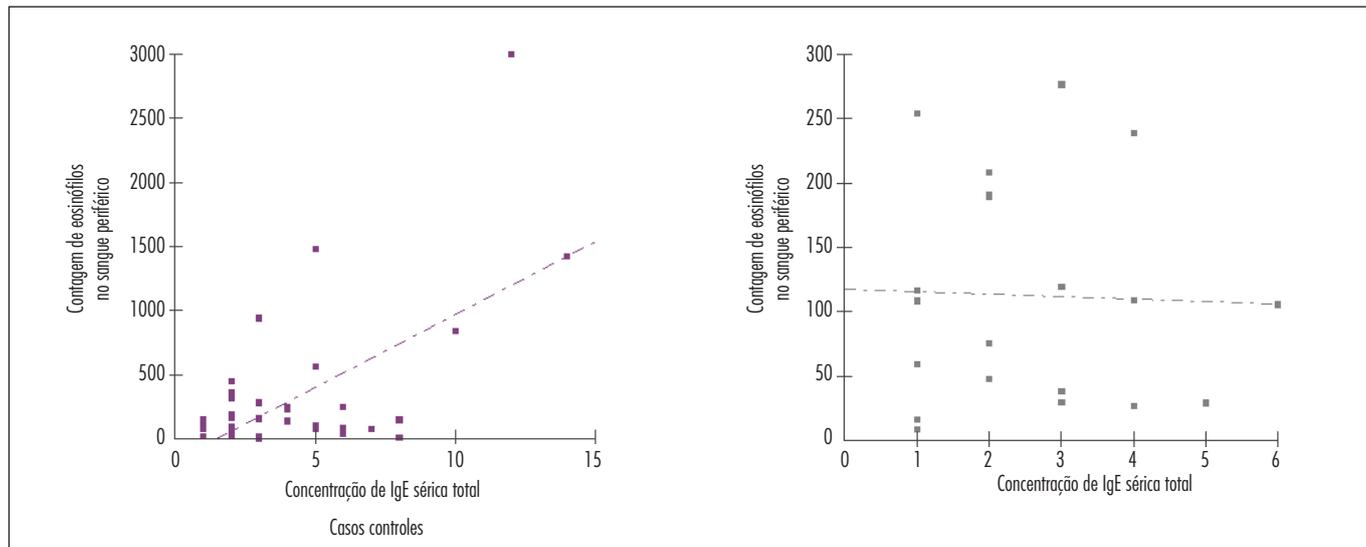


Figura 1. Correlação entre os níveis de imunoglobulina E total e eosinófilos no sangue periférico em pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente e grupo controle

Discussão

A CVV é um problema significativo em algumas mulheres, e sua recorrência têm sido associada a processos alérgicos e alterações imunológicas^{15,16}. Tradicionalmente, nos casos de alergias observa-se um aumento na população de eosinófilos. Neste estudo, verificou-se um aumento no número de eosinófilos no sangue periférico de pacientes com candidíase vaginal em comparação com o grupo de controle. Podemos inferir que exista uma resposta predominantemente TH2 (alérgica) entre as mulheres com CVV, refletindo talvez maior prevalência de pacientes alérgicos no grupo com CVVR.

Estudo recente confirma ainda um acréscimo importante na composição e variedade de fungos presentes na flora vaginal, como também um maior risco de aquisição de candidíase vaginal recorrente em mulheres chinesas que apresentavam rinite alérgica crônica¹⁶.

Por outro lado, estudos com pacientes com candidíase mucocutânea observou um aumento e/ou a ativação de eosinófilos no sangue periférico e na derme¹⁷. Talvez a infecção por candidíase por si só tenha um papel na ativação de eosinófilos no sangue periférico, uma vez que outros estudos também sugerem que a *candida* possa causar inflamação cutânea predominantemente composta por eosinófilos¹⁸.

Avaliando, entretanto, por outro prisma, a eosinofilia poderia ocorrer devido à resposta imune (alérgica) tipo TH2 induzida por anticorpos IgE específicos para *candida*^{18,19}. Colaborando com esses achados, outros estudos¹⁹⁻²¹ concluíram que a resposta imune vaginal alérgica

pode predispor uma candidíase crônica por indução da síntese de PGE2, que suprime a imunidade mediada por células. Fan et al.²⁰ quantificaram IgE no fluido vaginal de mulheres com CVV e observaram maior concentração de imunoglobulina IgE em pacientes com a doença em comparação com os controles.

Semelhante a estudo anterior conduzido por Neves et al.¹⁵, no presente estudo, não encontramos diferenças significativas ao quantificar a IgE específica e total entre mulheres com e sem CVVR. No entanto, Carvalho et al.²², ao analisar anticorpos IgE específicos para *candida* em amostras de soro e lavado vaginal, relatou um ligeiro acréscimo nas concentrações séricas desses anticorpos em comparação com os valores encontrados em amostras vaginais, embora não tenham sido diferenças significativas. Esse fato contradiz outros resultados encontrados na literatura, sugerindo que a resposta de hipersensibilidade vaginal IgE-mediada específica para *candida albicans* poderia ser um cofator para vaginite recorrente em certos grupos de mulheres²⁰.

Apesar desses achados interessantes que demonstram uma relação de eosinofilia no sangue e associação de IgE pressupondo um quadro com substrato de reação alérgica, os resultados do presente estudo devem ser analisados dentro de suas limitações, uma vez que as pacientes não se submeteram a testes alérgicos específicos.

Outra limitação que não pode ser esquecida está relacionada ao desenho do estudo, uma vez que se tratando de um corte transversal estas pacientes foram avaliadas em um único momento, não havendo, portanto, um seguimento posterior que possibilite descrever a evolução dos quadros clínicos de candidíase e sua associação posterior com alergias.

Referências

1. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essentials of clinical mycology*. 2 nd ed. New York: Springer; 2011.
2. Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17(3):340-5.
3. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37(3):250-61.
4. Watson C, Calabretto H. Comprehensive review of conventional and non-conventional methods of management of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2007;47(4):262-72.
5. Garcia RB, Bonifaz A, Chassin AO, Kuba EB, Ariza J, Cabello RR. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. *Ginecol Obstet Mex*. 2007;75(2):68-72.
6. Hanna S, Etzioni A. New host defense mechanisms against *Candida* species clarify the basis of clinical phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(6):1433-7.
7. Naglik JR, Moyes DL, Wächter B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*. 2011;13(12-13):963-76.
8. Fidel PL Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(1):2-12.
9. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;125(1-2):47-70.
10. Paulovičová L, Paulovičová E, Karelin AA, Tsvetkov YE, Nifantiev NE, Bystrický S. Humoral and cell-mediated immunity following vaccination with synthetic *Candida* cell wall mannan derived heptamannoside-protein conjugate: immunomodulatory properties of heptamannoside-BSA conjugate. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(2):179-87.
11. Kim J, Han BJ, Kim H, Lee JY, Joo I, Omer S, Kim YS, Han Y. Th1 immunity induction by ginsenoside Re involves in protection of mice against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(4):481-6.
12. Yano J, Noverr MC, Fidel PL Jr. Cytokines in the host response to *Candida* vaginitis: identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins.
13. Yano J, Noverr MC, Fidel PL Jr. Cytokines in the host response to *Candida* vaginitis: Identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins. *Cytokine*. 2012;58(1):118-28.
14. Ramírez-Santos A, Pereiro MJr, Toribio J. [Recurrent vulvovaginitis: diagnostic assessment and therapeutic management]. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99(3):190-8. Spanish.
15. Witkin SS. Immunologic factors influencing susceptibility to recurrent candidal vaginitis. *Clin Obstet Gynecol*. 1991;34(3):662-8.
16. Neves NA, Carvalho LP, De Oliveira MA, Giraldo PC, Bacellar O, Cruz AA, et al. Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(1):167-71.
17. Guo R, Zheng N, Lu H, Yin H, Yao J, Chen Y. Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis. *Microb Ecol*. 2012;64(4):918-27.
18. Tsunemi Y, Kadono T, Saeki H, Kikuchi K, Tamaki K, Sato S. Secondary cutaneous candidiasis with eosinophilia. *J Dermatol*. 2010;37(2):175-8.
19. Imanaka A, Inui S, Itoh H, Masahito T, Masahito K, Shigetoshi S, et al. Generalized candidiasis with eosinophilic infiltration and atypical clinical appearance. *Rinsho Derma (Tokyo)*. 2003;45(9):1005-6.
20. Mori A, Ikeda Y, Taniguchi M, Aoyama C, Maeda Y, Hasegawa M, et al. IL-5 production by peripheral blood Th cells of adult asthma patients in response to *Candida albicans* allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125 Suppl 1:48-50.
21. Fan SR, Liao QP, Liu XP, Liu ZH, Zhang D. Vaginal allergic response in women with vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008;101(1):27-30.
22. Ong PY, Ferdman RM, Church JA. Late-onset of IgE sensitization to microbial allergens in young children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2010;162(1):159-61.
23. Carvalho RJV, Cunha CM, Silva DAO, Sopenete MC, Urzedo JE, Moreira TA, et al. IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(4):434-8.