

**JOÃO CARLOS DE MELO ARAÚJO**



O PAPEL DO POLIMORFISMO G463A DO GENE DA  
MIELOPEROXIDASE EM PACIENTES DIABÉTICOS COM  
ONICOMICOSE

RECIFE-PE

2013

**JOÃO CARLOS DE MELO ARAÚJO**

**O PAPEL DO POLIMORFISMO G463A DO GENE DA  
MIELOPEROXIDASE EM PACIENTES DIABÉTICOS COM  
ONICOMICOSE**

2013

**JOÃO CARLOS DE MELO ARAÚJO**

**O PAPEL DO POLIMORFISMO G463A DO GENE DA  
MIELOPEROXIDASE EM PACIENTES DIABÉTICOS COM  
ONICOMICOSE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientado pela Profa. Dra. Rejane Pereira Neves e co-orientado pelo Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Linha de Pesquisa: Patologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Recife  
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A663p

Araújo, João Carlos de Melo.

O papel do polimorfismo g463a do gene da mieloperoxidase em pacientes diabéticos com onicomicose / João Carlos de Melo. – Recife: O autor, 2013.

82 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.

Inclui referências e anexos.

1. Onicomicose. 2. Candida. 3. Diabetes Mellitus. 4. Polimorfismo Genético. 5. Mieloperoxidase. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-0158)



## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

### **Centro de Ciências da Saúde - UFPE**

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.pospat.ufpe.br>

---

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.**

**AUTOR: JOÃO CARLOS DE MELO ARAÚJO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “O PAPEL DO POLIMORFISMO G463A DO GENE DA MIELOPEROXIDASE EM PACIENTES DIABÉTICOS COM ONICOMICOSE.”**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. REJANE PEREIRA NEVES**

**DATA DA DEFESA: 28 DE FEVEREIRO DE 2013**

### **BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Rabelo de Carvalho**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
REITOR**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Francisco de Sousa Ramos

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA  
CHEFE**

Profa. Catarina de Oliveira Neves

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO  
COORDENADOR**

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

**VICE-COORDENADOR**

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

**CORPO DOCENTE**

Profa. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Prof. Jacinto da Costa Silva Neto

Profa. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Lucas André Cavalcante Brandão

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Profa. Maria Bernadete Souza Maia

Profa. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Profa. Paloma Lys de Medeiros

Profa. Rejane Pereira Neves

Prof. Roberto José Vieira de Mello

Profa. Willa Tatiana Ferreira e Silva

Dedico este trabalho a minha mãe, meus irmãos, a minha esposa Juliana Arôxa e aos nossos  
filhos.

# **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter nascido em uma família que sempre me incentiva para o meu crescimento. Agradeço a todos os profissionais do Programa de Pós-graduação em Patologia e de Departamento de Micologia da UFPE, do Centro Ermírio de Moraes, do Centro de Patologia e Medicina Laboratorial da UNCISAL.

Agradeço a minha esposa Juliana que se desdobrou na conclusão deste trabalho e as nossas crianças que souberam compreender iluminadamente o nosso momento.

## Resumo

O Diabetes Mellitus tipo 2 é uma doença de grande prevalência e alta mortalidade em todo o mundo. A persistência da hiperglicemia no curso da doença está envolvida com padrões clássicos de nefropatia, retinopatia e neuropatia. Tais complicações associadas a maior susceptibilidade dos diabéticos em desenvolverem infecções, agravam mais ainda a qualidade de vida destes pacientes. Nesse contexto, as infecções fúngicas são relevantes, associadas à grande disseminação e difícil tratamento, sendo as onicomicoses as mais frequentes em pacientes diabéticos. Em nosso trabalho a frequência das onicomicoses foi determinada em 66 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, atendidos no Centro de Referência para Diabetes Ermírio de Moraes, na cidade do Recife, durante o período de junho a novembro de 2013. Todos os 66 pacientes com Diabetes tipo 2 apresentaram algum sinal clínico para onicomicoses. Destes 24 (36,3%) revelaram confirmação para etiologia fúngica, destacando-se *Candida krusei* (45,8%) como uma das espécies mais frequentes. Taxas de glicemia e hemoglobina glicosilada estiveram elevadas em 37,5% dos pacientes com micoses. A frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G463A do gene *MPO* foi para G/G(36%), G/A(43%) e A/A(27%). Não foi detectada associação ao se relacionar à micose, diabetes e o polimorfismo (G463A).

**Palavras-chave:** Onicomicose. *Candida*. Diabetes Mellitus. Polimorfismo Genético. Mieloperoxidase.

## Abstract

Diabetes mellitus type 2, is a disease with high prevalence and high mortality worldwide. The persistence of hyperglycemia in the disease course is observed with classic patterns of nephropathy, retinopathy and neuropathy. Such complications associated with increased susceptibility of diabetic patients are known to develop infections, which aggravate further the quality of life of these patients. In this context fungal infections are relevant associated with the large spread and difficult treatment being onychomycosis the most frequent in diabetic patients. In our study the frequency of onychomycosis was determined in 66 patients with type 2 diabetes treated at the Reference Center for Diabetes Ermirio de Moraes, in Recife during the period June to November 2013. All 66 patients with type 2 diabetes showed clinical signs for onychomycosis. Of these, 24 (36.3%) revealed confirmation for fungal etiology, especially *Candida krusei* (45.8%) as one of the most frequent species. Rates of glucose and glycated hemoglobin were elevated in 37.5% of patients with mycosis. The frequency of genotypes and alleles of the polymorphism G463A gene MPO G / G (36%), G / A (43%) A/A (27%). No association was found to be related to ringworm, diabetes and polymorphism (G463A).

**Keywords:** Onychomycosis. *Candida*. Diabetes Mellitus. Polymorphism. Myeloperoxidase.

## Lista de Quadros e Tabelas

Tabela 1.....21

Tabela 2.....41

### **Artigo 1**

Gráfico 1.....47

Tabela 1.....48

Tabela 2.....48

Tabela 3.....48

### **Artigo 2**

Tabela 1.....57

Tabela 2.....58

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>A</b> .....	Adenina
<b>Å</b> .....	Ângström
<b>AC</b> .....	Anticorpo
<b>ADA</b> .....	Associação Americana de Diabetes
<b>Asn</b> .....	Asparagina
<b>C</b> .....	Citosina
<b>C2</b> .....	Componente do sistema complemento
<b>C3</b> .....	Componente do sistema complemento
<b>C4</b> .....	Componente do sistema complemento
<b>DM</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i>
<b>DM1</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
<b>DM2</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
<b>DMG</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
<b>DRC</b> .....	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
<b>G</b> .....	Guanina
<b>Glu</b> .....	Glutamato ou Ácido glutâmico
<b>Gly</b> .....	Glicina
<b>HbA</b> .....	Hemoglobina A
<b>HbA1c</b> .....	Hemoglobina glicada
<b>HIV</b> .....	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IDDM</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i> insulino-dependente
<b>IDF</b> .....	Federação Internacional de Diabetes
<b>IL</b> .....	Interleucina
<b>kDa</b> .....	Kilodalton
<b>LADA</b> .....	Diabetes auto-imune latente do adulto
<b>LDL</b> .....	Lipoproteína de baixa densidade
<b>M</b> .....	Molar
<b>MAP ou sMAP</b> .....	Pequena proteína associada à MBL
<b>MASP</b> .....	Serino protease associada à MBL

<b>MBL</b> .....	Lectina Ligadora de Manose
<b>MODY</b> .....	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
<b>MPO</b> .....	Mieloperoxidase
<b>NIDDM</b> .....	Diabetes <i>mellitus</i> não insulino-dependente
<b>OMS</b> .....	Organização Mundial de Saúde
<b>PEPC</b> .....	Peptídeo C
<b>Pro</b> .....	Prolina
<b>SC</b> .....	Sistema Complemento
<b>T</b> .....	Timina
<b>TNF</b> .....	Fator de Necrose Tumoral
<b>TOTG</b> .....	Teste de Tolerância Oral à Glicose
<b>Xaa</b> .....	Representação de qualquer aminoácido

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 POLIMORFISMOS GÊNICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 MIELOPEROXIDASE E POLIMORFISMO G463A.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 DIABETES <i>MELLITUS</i>.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES.....	21
2.3.2 PATOGÊNESE DO DIABETES.....	24
2.3.3 COMPLICAÇÕES DO DIABETES .....	26
2.3.4 DIABETES <i>MELLITUS</i> E INFECÇÃO.....	28
<b>2.4 INTERAÇÃO FUNGO X HOSPEDEIRO.....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	36
4.2 LOCAL DO ESTUDO.....	37
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	37
4.4 PERÍODO DE REALIZAÇÃO.....	37
4.5 DESENHO DO ESTUDO.....	37
4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	38
4.7 MÉTODOS DE COLETA.....	38
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 ARTIGO 1.....	42
5.2 ARTIGO 2.....	53
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>ANEXOS</b> .....	77
ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética.....	77
ANEXO II - Autorização do Hospital Ermírio de Moraes.....	78
ANEXO III - Carta de Anuência da Prefeitura do Recife - Secretaria de Saúde.....	79
ANEXO IV - Modelo de Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	80



# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica, considerada uma das mais prevalentes na população mundial (BASTOS JR. *et al*, 2005), e se caracteriza por hiperglicemia resultante da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina em exercer adequadamente os seus efeitos (OLIVEIRA *et al*, 2009).

É classificado de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2011) segundo quatro formas clínicas: diabetes *mellitus* tipo 1, diabetes *mellitus* tipo 2, diabetes *mellitus* gestacional e diabetes secundária a outras patologias (ADA, 2011).

Trata-se de um distúrbio metabólico associado à deficiência absoluta ou relativa de insulina, gerando um aumento da glicemia. Na sua expressão clínica é caracterizado por alterações metabólicas, complicações vasculares e neuropáticas (ARSA *et al*, 2009).

O comprometimento vascular é constituído por macroangiopatia inespecífica (aterosclerose e suas diferentes manifestações clínicas) e pela microangiopatia diabética, a qual afeta particularmente a retina, os rins e os nervos periféricos (CHACRA, AR; DIB, AS, 2007).

Ao lado das doenças vasculares, existe uma maior incidência de infecções específicas no paciente diabético. Estas infecções evoluem frequentemente com complicações, podendo ainda agravar o quadro de cetoacidose e coma hiperosmolar (ROCHA *et al*, 2002).

Indivíduos com o DM apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções, incluindo infecções fúngicas. Entretanto, ainda não estão completamente elucidadas as causas para esta condição. Sabe-se que portadores dessa doença apresentam alterações no sistema de defesa com depressão da atividade dos polimorfonucleares neutrófilos, alteração na aderência, quimiotaxia e opsonização leucocitária, alteração dos sistemas antioxidantes e menor produção de interleucinas (ROCHA *et al.*, 2002).

A incidência de infecções cutâneas em diabéticos é de 20 a 50% e mostra uma correlação próxima com os níveis sanguíneos de glicose, aparecendo com maior frequência em pacientes com hiperglicemia e com valores altos de hemoglobina glicosilada (RODRÍGUES, 2003).

Os pés são os alvos mais acometidos por processos infecciosos (JOSHI *et al*, 1999) sendo as infecções fúngicas as mais comuns nesta região (BRISTOW, 2008), podendo ser porta de entrada para outros agentes infectantes, como o *Staphylococcus aureus*, favorecendo o surgimento de outras comorbidades (WEBWER e SILVA, 2005; RAMOS, 2010).

Os mediadores da resposta inflamatória, assim como as enzimas envolvidas, incluindo a mieloperoxidase (MPO), associado à ação das células fagocitárias, fazem parte da resposta imune inata inicial aos microrganismos, tendo como principal objetivo, impedir a instalação das infecções (FILHO *et al.*, 2011).

A eliminação do agente infeccioso no hospedeiro ocorre através da fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos. Esta etapa é desempenhada em grande parte por mecanismos dependentes de oxigênio, que geram intermediários reativos do oxigênio, produzidos na rápida oxidação da NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P) pela NADPH oxidase, formando o  $O_2^-$  (ânion superóxido), que é convertido a  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio). Este último é um agente microbicida, porém ainda não é suficientemente eficaz para matar os microrganismos por si só (ABBAS, 2005).

A amplificação da resposta do produto  $H_2O_2$  é alcançada pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO) que, na presença de um halóide  $Cl^-$  (cloreto), converte o  $H_2O_2$  em HOCl (ácido hipocloroso). O HOCl é um potente agente antimicrobiano, fazendo com que o sistema  $H_2O_2$ -MPO-halida seja o sistema microbicida mais eficaz dos neutrófilos (ABBAS, 2005).

Por outro lado, os portadores de alteração na transcrição da mieloperoxidase, demonstram uma resposta mais lenta no combate às infecções por microrganismos. Como citado por Costa (2004), o polimorfismo G463A do gene da mieloperoxidase, provoca uma expressão diminuída desta enzima, aumentando a susceptibilidade às infecções e, possivelmente, sugerindo que este alelo, seja usado como um marcador para eventos infecciosos em pacientes com defesa imune já comprometida (COSTA, 2004).

Estudos vêm sendo realizados buscando avaliar essa possível correlação entre polimorfismos no gene 463 A, com consequente baixos níveis séricos de MPO, e a susceptibilidade às infecções, entre elas a infecção fúngica (AMPEL *et al.*, 2009).

Também existem relatos que associam essa deficiência a afecções clínicas, entre estas, o diabetes *mellitus* (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Alguns estudos buscam entender a maior susceptibilidade de indivíduos diabéticos a infecções (HOVIND *et al.*, 2005; KAUNISTO *et al.*, 2009), porém as evidências clínicas que sustentam essa associação não estão esclarecidas.

Dessa forma, o presente estudo apresenta como propósito correlacionar o polimorfismo G463A às micoses superficiais no diabetes *mellitus*.



# REVISÃO DA LITERATURA

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste estudo realizamos revisão de literatura de todo o contexto dos Polimorfismos Gênicos, Mieloperoxidase e Polimorfismo G463A, Diabetes.

### 2.1 POLIMORFISMOS GÊNICOS

Com a finalização do Projeto Genoma Humano, em meados do ano 2000, foi anunciado o sequenciamento completo do genoma humano. O tamanho estimado do genoma humano é de 3.289 Mb. O menor cromossomo é o 21, com 45 Mb, e o maior é o 1, com 279 Mb. O número estimado de genes codificadores de proteínas no genoma humano é estimado em cerca de 20.000 a 30.000. Os genes codificadores de proteínas correspondem apenas 1,5% do genoma humano. Os genes são formados por éxons, sequências pequenas que codificam aminoácidos, e por íntrons, sequências grandes não traduzidas. Entretanto, os genes identificados em humanos são mais complexos, e há mais processamento (*splicing*) alternativo, levando a maior número de produtos proteicos por gene (CARVALHO, 2011).

No genoma humano foi identificado mais de 1,4 milhão de sítios de polimorfismo de nucleotídeos únicos (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). Painéis associando centenas de milhares de SNP estão disponíveis comercialmente e podem ser usados, por exemplo, em estudos de associação. Na maioria desses estudos, compara-se a frequência dos alelos em diferentes SNP entre casos e controles. Entretanto, variações de frequências alélicas entre populações ou mesmo entre grupos dentro de uma mesma população são frequentes, podendo levar a resultado falso negativos. Portanto, todos os resultados de estudos de associação devem ser confirmados em mais de uma população (CARVALHO, 2011).

Repetições de sequência simples (RSS) correspondem a 3% do genoma humano, sendo cerca de 1 a cada 2 Kb. As mais comuns são repetições de dinucleotídeos, como as repetições de CA, AT e AG, que correspondem a 0,5% do genoma. Essa classe de repetição tem grande interesse, pois frequentemente apresenta polimorfismos no número de repetições. Algumas têm tanta variação que a maioria dos indivíduos da população possui alelos diferentes para uma mesma repetição, ou seja, o número de repetições de determinada RSS difere entre o cromossomo materno e paterno (CARVALHO, 2011).

Com o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular criou-se a possibilidade de comparar diretamente as seqüências de nucleotídeos que existem no mesmo loco. Através de estudos em populações, demonstrou-se que raramente existe uma única forma alélica para cada loco. Dentro de uma população, espera-se que várias formas alélicas estejam presentes, ou seja, quando se faz a análise da seqüência de nucleotídeos que caracteriza um determinado gene não existe “O Alelo Normal” e muito menos “O Alelo Mutante” e sim, várias formas alélicas que resultam na produção de proteínas com funcionamento normal e várias formas alélicas que codificam proteínas que terão desempenhos alterados. Isso significa que, mesmo nos casos em que os indivíduos da população possam ser classificados em apenas dois fenótipos (normal e anormal), existirá uma variabilidade alélica muito maior do que apenas dois alelos (SNUSTAD, 2008).

Quando na população existirem formas alélicas com freqüências superiores a 1% , o loco passa a ser considerado polimórfico. Nos casos em que a freqüência do alelo mais comum é igual ou maior que 99%, não se considera a presença das outras formas alélicas como significativa e o loco é denominado de monomórfico (presença de apenas uma forma alélica) (SNUSTAD, 2008).

As formas alélicas surgem através do processo de mutação. Esse termo foi criado para designar toda e qualquer alteração do material genético que fosse transmitida para a descendência. Essa definição inclui as mutações nas células germinativas e nas células somáticas e, em relação ao tamanho, pode se referir tanto a grandes alterações na informação genética (mutações genômicas e cromossômicas) quanto a alterações em um número menor de pares de bases (mutações gênicas) (SNUSTAD, 2008).

O novo alelo pode conferir uma melhoria no valor adaptativo do organismo, sendo considerado benéfico; pode não interferir no valor adaptativo do organismo, sendo considerado neutro ou pode impedir ou reduzir a capacidade funcional do organismo, sendo considerado deletério. Esta avaliação, no entanto, somente é possível a partir da expressão da nova variante (SNUSTAD, 2008).

Em geral, quando alelos novos estão associados a características indesejáveis, sua freqüência tende a manter-se em níveis baixos na população. Em se tratando de uma patologia congênita, podemos supor que o potencial reprodutivo do organismo seja diminuído (ou até mesmo perdido) e, com isso, a transmissão do alelo às gerações descendentes é restrita (COSTA, 2004).

Entretanto, caso o novo alelo não esteja diretamente relacionado a uma diminuição no potencial reprodutivo do organismo, ele será transmitido ao longo das gerações e poderá constituir um polimorfismo genético (CARVALHO, 2011).

Atualmente, diversos polimorfismos genéticos vêm sendo relacionados a um aumento de risco de ocorrência e/ou recorrência de uma série de patologias multifatoriais, sendo considerados como parte do componente genético que eleva a susceptibilidade de um indivíduo, consistindo em um risco relativo aumentado. Basicamente o risco relativo é uma relação matemática entre a frequência do polimorfismo na população e entre os parentes dos indivíduos acometidos (CARVALHO, 2011).

## **2.2 MIELOPEROXIDASE E POLIMORFISMO G463A**

A MPO é uma hemoproteína localizada nos grânulos azurófilos dos monócitos e leucócitos polimorfonucleares tendo grande atuação nos processos inflamatórios. A sua síntese ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e está completa dentro dos granulócitos a sua entrada na circulação. A MPO é uma proteína catiônica, tem peso molecular de 144 kD, consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos (PIEDRAFITA, 1996).

Durante o processo de fagocitose a destruição de agentes estranhos nos neutrófilos é acompanhada por processo dependente de formas ativas de oxigênio. Deste processo participa a NADPH oxidase que reduz oxigênio a superóxido e que por sua vez é espontaneamente convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida por este sistema é insuficiente para induzir a efetiva morte das bactérias. A mieloperoxidase na presença de haletos, tais como CL, converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para HOCl, que é um potente agente microbicida (KLEBANOFF, 2002). Este é o sistema mais eficiente que age na morte de bactérias em neutrófilos (KLEBANOFF, 2002).

Sabe-se, por exemplo, que HOCl além de um potente agente microbicida, também está envolvido na sinalização da apoptose de vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune. Além disto, produtos gerados a partir de HOCl (por exemplo, cloraminas (R-NHCl) e IO<sub>2</sub>) são capazes de ativar a produção de citocinas, assim como ativação de quinases e

outras enzimas (PIEDRAFITA *et al.*, 1992). Diante desses fatos se espera que MPO tenha um efeito sinalizador que vai além de seus efeitos microbicidas ou regulatórios (PIEDRAFITA *et al.*, 1992).

A atividade catalítica da MPO resulta na geração de vários oxidantes reativos. Embora estas espécies oxidativas tenham um papel importante na morte de microrganismos patógenos, elas também provocam danos tissulares no hospedeiro, através da modificação oxidativa de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocasionando uma grande variedade de doenças inflamatórias crônicas (KLEBANOFF, 2002).

Kumar e colaboradores (2004) demonstraram em humanos que a localização intracelular de MPO depende da presença de alguns fatores. Por exemplo, quando macrófagos são estimulados com GM-CSF a enzima está dispersa no citosol e região perinuclear, enquanto quando são estimulados por M-CSF, a distribuição é periférica (KUMAR *et al* 2004). Assim, é possível que o papel da MPO esteja relacionado com a sua localização na célula. A localização da MPO em grânulos próximos ao fagolisossoma e a formação de oxigênio singlete no fagolisossoma poderia compor a atividade microbicida da célula, enquanto que a localização perinuclear de MPO e, portanto, de  $1O_2$ , poderia ser responsável pela produção de moléculas envolvidas na sinalização (PIEDRAFITA, 1996).

Piedrafita *et al* (1996) demonstraram que existe um polimorfismo funcional localizado em uma região promotora (posição -463) do gene que expressa a MPO. O qual na presença do alelo A ao invés do alelo G, diminuiria a expressão da MPO pelas células. O genótipo GG predomina na população norte-americana (60-66%) e pode estar associado a um aumento de duas a três vezes os níveis de MPO em relação aos genótipos A/G e A/A (PIEDRAFITA, 1996).

Vários estudos encontraram associação do polimorfismo G463A com um risco aumentado de doenças coronarianas, ligada sempre ao genótipo G/G. Por outro lado, o genótipo A/A com frequência aparece associado a um menor risco destas doenças. Compreendendo que o genótipo G/G está correlacionado com uma maior expressão do gene MPO e maiores níveis de MPO plasmática, a consequência deste fato é a existência de uma resposta inflamatória mais intensa, com grande produção de espécies oxidativas danosas à parede vascular das artérias. Desta forma, é aceitável entender que a presença do alelo A no polimorfismo G463A da MPO, expressa menos esta enzima, gerando menos espécies

oxidativas, conseqüentemente encerrando um menor poder microbica (REYNOLDS *et al*, 2002).

Na avaliacao do SNP G-463A na regio promotora do gene MPO em pacientes portadores de anemia falciforme, Costa sugeriu fortemente que em pacienes heterozigotos G/A, existe provavelmente uma maior incidência de eventos infecciosos, bem como uma maior associacão ao alelo A. O genótipo AA ou AG aparentemente elevou o risco de eventos infecciosos, enquanto o genótipo GG pareceu estar associado à ausencia de infecções. O fato da distribuicão dos genótipos entre os pacientes falcêmicos e o grupo controle serem semelhantes indicou que a predisposicão a infecções foi realmente devida à presenca do alelo A (COSTA, 2004).

O polimorfismo -463A diminui a expressão da MPO que por sua vez leva a reducão da capacidade bactericida *in vitro* dos leucócitos. Apesar dos dados *in vitro* indicarem que a deficiência da MPO em neutrófilos parece não ser vital na funçao antimicrobica, é possível que, *in vivo*, a atividade da MPO possa modular a resposta inflamatória diminuindo o dano celular provocado pelas bactérias. O sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haletio é um potente sistema microbica e sua falta ou diminuicão de sua atividade em pacientes que já possuem uma debilidade na resposta imune pode ainda mais predispor-los a eventos infecciosos mais graves (COSTA, 2004).

### **2.3 DIABETES MELLITUS**

O diabetes *mellitus* é uma doenca endócrina caracterizada por desordens metabólicas, as quais apresenta elevada glicemia de jejum (hiperglicemia) e pós-prandial, devido a menor sensibilidade insulínica em tecidos alvo e/ou reduzida secreçao de insulina (ARSA *et al*, 2009).

Em 2010, estimava-se em 285 milhões o número de pessoas acometidas pela doenca em todo mundo (ROCHA, 2011), afetando cerca de 16 milhões de pessoas nos Estados Unidos e, no Brasil, o número estimado foi de aproximadamente 10,3 milhões (ABBAS, 2005).

A prevalência mundial da doenca tem apresentado um crescimento com proporções epidêmicas. Esse aumento deve-se a maior longevidade da populacão, associada ao consumo

aumento de gorduras saturadas e sedentarismo com conseqüente obesidade (FORTI *et al.*, 2006).

Estima-se que até 2030, o número de pessoas diabéticas acima dos 64 anos de idade seja superior a 82 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento e superior a 48 milhões nos países desenvolvidos (WILD *et al.*, 2004).

O Brasil, que no ano 2000 ocupava o oitavo lugar entre os dez países com maior número de diabéticos, apresentando 4,6 milhões de pessoas (WILD *et al.*, 2004), ocupou em 2010 a quinta posição, totalizando 7,6 milhões de pessoas diagnosticadas (SHAW *et al.*, 2010).

A ocorrência do diabetes *mellitus* é um fenômeno universal e afeta populações de países em todos os estágios de desenvolvimento. Dessa forma, observa-se o aumento da frequência dessa doença nas estatísticas de mortalidade, tanto como causa básica ou contributória, especialmente associada a doenças renais, cardiovasculares e cerebrais (CESSE *et al.*, 2009).

Segundo Deshpande, Harris-Hayes e Schootman (2008), o diabetes no ano de 2002 foi a sexta maior causa de morte, com 73.249 listagens de óbitos tendo a diabetes como causa base da morte e um adicional de 224.092 atestados com essa doença associada à morte. Em 2004, um número estimado de 3,4 milhões de pessoas foi a óbito por conseqüências de elevada taxa glicêmica, e estima-se que esse número duplique entre os anos 2005-2030 (ZHANG, 2010).

De acordo com Zhang e colaboradores (2010), os diabéticos representam o maior número de consultas ambulatoriais, maior uso de medicamentos, bem como uma maior probabilidade de hospitalização quando comparados a não diabéticos (ZHANG, 2010).

Esses fatores tornam o DM responsável por gastos expressivos em saúde, além de substancial redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida (GÓES *et al.*, 2007).

Segundo Barcelò e colaboradores (2003), medicamentos, hospitalizações e consultas representam, respectivamente, 43%, 10% e 24% dos custos diretos com diabetes *mellitus* na América Latina (BARCELÒS *et al.*, 2003).

O diabetes é uma doença crônica que exige a manutenção do atendimento médico para redução do risco de complicações em longo prazo. O plano de gestão deve ser formulado como uma aliança de colaboração terapêutica entre o paciente, a família e o médico, bem como outros profissionais de saúde (ADA, 2011).

De acordo com a *American Diabetes Association* (2011) o diagnóstico de DM baseia-se nos seguintes critérios:

**Tabela 1.** Critérios de diagnóstico do diabetes *mellitus* segundo a Associação Americana de Diabetes (2011)

\* **Glicemia de jejum\***  $\geq 126\text{mg/dL}$

O jejum é definido como ausência de ingestão calórica por, pelo menos, 8h.

\* **Glicose plasmática\***  $\geq 200\text{mg/dL}$ , 2h após ingestão de glicose durante o **TOTG**

O teste deve ser realizado como descrito pela OMS por ingestão de 75g de glicose anidra dissolvida em água.

\* **HbA1c**  $\geq 6,5\%$

\* **Hiperglicemia ocasional**  $\geq 200\text{mg/dL}$  em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica.

\*Na ausência de hiperglicemia inequívoca, o resultado deve ser confirmado pela repetição do teste.

Fonte: ADA, 2011

Segundo a Associação Americana de Diabetes - ADA (PAPELBAUM *et al*, 2011), os pacientes diabéticos devem manter baixos níveis de hemoglobina glicada, pressão arterial e lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo que o nível glicêmico máximo considerado normal da glicemia de jejum é de 99mg (PAPELBAUM *et al*, 2011).

Em torno de 10% dos pacientes apresentam os três critérios acima citados e como consequência, o controle da doença torna-se inadequado, levando a um aumento na morbidade e mortalidade (PAPELBAUM *et al*, 2011).

### 2.3.1 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES

Segundo a ADA (2011), a classificação do diabetes inclui quatro classes clínicas: DM tipo1, DM tipo 2, DMG e outros tipos específicos de diabetes devido a diversas causas como, as doenças do pâncreas exócrino como fibrose cística; uso de drogas após transplante de órgãos, etc (ADA, 2011).

Pode-se ainda citar o diabetes neonatal, quando é constatada hiperglicemia nos primeiros três meses de vida. É uma condição rara, que pode estar associada ao retardo do crescimento intrauterino. Pacientes com diabetes neonatal transitório pode mais tarde apresentar diabetes permanente (CRAIG *et al*, 2009).

Pacientes com DM tipo 1 apresentam insulinoopenia absoluta pronunciada com perda da função secretória das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, enquanto que pacientes com DM tipo 2 apresentam secreção de insulina normal ou elevada, porém insuficiente para suprir a demanda exacerbada pela resistência insulínica (RODACKI *et al*, 2008).

O DM tipo 1 é responsável por cerca de 5% a 10% de todos os casos de DM (DESHPANDE *et al*, 2008) sendo subdividido em Tipo 1A, tipo 1B e diabetes auto-imune latente em adultos (LADA) (FORTI *et al*, 2006).

Pacientes com início abrupto dos sinais e sintomas, e descompensação metabólica pronunciada necessitando de insulinoaterapia desde o início do tratamento geralmente são incluídos na categoria DM tipo 1 clássico (RODACKI *et al*, 2008). Uma característica marcante nesses indivíduos é a tendência à cetose; podendo ser a cetoacidose diabética a manifestação inicial da doença em até 30% dos casos (FORTI *et al*, 2006).

Apesar dos pacientes DM tipo 1 ser em sua maioria crianças, adolescentes ou adultos jovens, o diagnóstico pode ser estabelecido em qualquer faixa etária (RODACKI *et al*, 2008). Esse tipo de diabetes é caracterizado pela destruição de células  $\beta$  pancreáticas, tornando-se clinicamente sintomática quando aproximadamente 90% das células  $\beta$  do pâncreas são destruídas (CRAIG *et al*, 2009).

No DM tipo 1A, a destruição das células  $\beta$  é de etiologia autoimune, representando 90% dos casos, enquanto que o DM tipo 1B não apresenta causa conhecida (idiopático), sendo este último descrito inicialmente em asiáticos e africanos. Entretanto, essa forma vem sendo melhor estudada, descrita em outras populações como uma nova nomenclatura “DM com tendência à cetoacidose” (MARASCHIN *et al*, 2010).

Na grande maioria dos casos, a agressão inicial às células  $\beta$  ocorre devido à ação dos anticorpos produzidos contra antígenos virais, que lesiona as células  $\beta$ , devido a um mimetismo molecular entre os antígenos virais e os antígenos dessas células (FORTI *et al*, 2006).

No DM tipo LADA, ocorre destruição das células  $\beta$  do pâncreas, porém de forma mais lenta quando comparado ao DM tipo 1A. Acomete, geralmente, adultos jovens, entre os 30 e 50 anos de idade; e representa cerca de 10% dos casos de DM tipo 1 (FORTI *et al*, 2006).

As características dos pacientes com DM tipo LADA são peculiares. Estes não são obesos e o diagnóstico acontece em idade compatível com o diagnóstico de DM tipo 2 (MARASCHIN *et al*, 2010). Pacientes com esse tipo de diabetes apresentam hiperglicemia

acentuada sintomática nos primeiros 6 a 12 meses, porém não havendo requerimento de insulina nesse período, o que o assemelha ao DM tipo 2, entretanto apresentam autoanticorpos contra as células  $\beta$  e progressão mais rápida a insulino-dependência (CAL SOLARI *et al*, 2008).

O DM tipo 2 é responsável por mais de 90% dos casos, não apresentando componente auto-imune (MARASCHIN *et al*, 2010). Esse tipo possui um componente genético influenciado pelo meio ambiente (dieta e atividade física) e cuja interação contribui para a manifestação clínica da doença (ZHANG, 2010).

Em geral ocorre em indivíduos acima dos 30 anos com histórico familiar da doença. O tratamento é geralmente realizado com dieta e agentes hipoglicemiantes orais, sem necessidade do uso de insulina. Quando o uso da insulina se faz necessário, ocorre em média após cinco anos de diagnóstico, diferenciando esse tipo do DM tipo 1, no qual há dependência da insulina (MARASCHIN *et al*, 2010).

Embora todas as formas de diabetes melitos apresentem em comum à hiperglicemia, os processos patogênicos envolvidos no desenvolvimento da mesma, variam muito. A grande maioria dos casos de diabetes se enquadra em duas categorias principais, como foi definido anteriormente (ABBAS, 2005):

O diabetes tipo 1 representa cerca de 10% de todos os casos e é caracterizado por uma deficiência absoluta de insulina, causada pela destruição das células betas pancreáticas (ROCHA, 2011).

O diabetes tipo 2 compreende entre 80 a 90% dos pacientes, e é causado por uma combinação de resistência periférica à insulina e uma resposta secretora inadequada das células betas (ROCHA, 2011)..

Embora o DM tipo 1 e o DM tipo 2 respondam pela maioria dos casos, reconhecem-se inúmeras outras causas de DM, que do ponto de vista etiológico, comprova a heterogeneidade da doença (ROCHA, 2011).

As formas monogênicas de diabetes resultam de defeitos genéticos na função das células betas ou na ação da insulina, enquanto que o diabetes melitos gestacional é caracterizado por diminuição da tolerância aos carboidratos, acompanhada de hiperglicemia, com início, ou diagnosticado durante a gestação. É atribuído a elevação dos níveis de hormônios contrareguladores da insulina, ao estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores genéticos ou ambientais (ROCHA, 2011).

O diabetes *mellitus* gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiramente identificada na gestação (FORTI *et al*, 2006).

As modificações hormonais ocorridas durante a gravidez ocasionam condições favoráveis à diminuição da tolerância à glicose. Os hormônios produzidos pela placenta como o estrogênio, a progesterona e a gonadotrofina coriônica possuem a capacidade de bloquear o efeito da insulina; efeito este instalado entre a 20<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de gestação. Com o avanço da gestação a produção hormonal da placenta tende a ampliar, podendo assim iniciar a resistência à insulina. Em muitas mulheres o pâncreas é capaz de produzir uma quantidade adicional de insulina, compensando o efeito resistente. Porém, quando o pâncreas atinge o máximo de sua produção de insulina e a quantidade produzida ainda é insuficiente para reverter os efeitos dos hormônios placentários, tem-se como resultado o diabetes gestacional (SCHMITT *et al*, 2009).

### 2.3.2 PATOGÊNESE DO DIABETES

#### ✓ Patogênese do Diabetes Mellito tipo 1

Existem evidências suficientes para se afirmar a participação de fatores genéticos no surgimento do DM 1, embora os mecanismos sejam em parte desconhecidos. Entre os possíveis loci de suscetibilidade envolvidos na doença, o HLA, localizado no cromossomo 6p21, é o mais conhecido e importante. Já entre os fatores ambientais possivelmente envolvidos, destacam-se as infecções virais, que podem funcionar como gatilho para a destruição das células betas (ROCHA, 2011).

Embora os aspectos clínicos do DM tipo 1 surjam frequentemente de forma abrupta, o processo autoimune inicia-se muitos anos antes, com queda progressiva das reservas de insulina ao longo do tempo. Hiperglicemia e cetose ocorrem tardiamente, depois que mais de 90% das células betas são destruídas (ROCHA, 2011).

✓ Patogênese do Diabetes Mellito tipo 2

Os dois defeitos metabólicos que caracterizam o diabetes tipo 2 são: um é a redução na habilidade dos tecidos periféricos de responderem à insulina (resistência à insulina) e o outro é uma disfunção das células betas, que se manifesta pela secreção inadequada de insulina diante da resistência à mesma e à hiperglicemia. Na maioria dos casos, a resistência à insulina é o evento primário, sendo seguido de graus variáveis de disfunção das células betas (ABBAS, 2005).

A resistência à insulina resulta de diversos defeitos em sua via de sinalização, com destaque para o papel da obesidade, em particular da obesidade visceral (aumento da gordura mesentérica e omental), que resulta em acúmulo no fígado e nos músculos estriados; do excesso de ácidos graxos livres (ácidos graxos não esterificados) circulantes, havendo correlação inversa entre a concentração plasmática de ácidos graxos livres no estado de jejum e a sensibilidade à insulina; diminuição dos níveis de adiponectina, adipocina anti-hiperglicêmica que melhora a sensibilidade à insulina na medida em que potencializa a atividade da enzima AMPK (AMP- activated protein kinase); secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo visceral, hoje reconhecido como um órgão autócrino-parácrino-endócrino funcional de alta complexidade, capaz de secretar mais de uma centena de peptídeos bioativos em resposta a alterações do estado metabólico, e não como mero tecido de sustentação ou depósito inerte de gordura (ROCHA, 2011).

A disfunção das células betas associadas à resposta à insulina resulta de esgotamento de sua capacidade adaptativa. Elas são obrigadas a manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade e promovem por tempo prolongado, secreção excessiva de insulina. No DM tipo 2 existe também diminuição da secreção de GLP-1 (VELLOSO, 1995).

Por fim, é importante reconhecer que 15 a 20% dos pacientes supostamente portadores de DM tipo 2 são na verdade acometidos por uma forma peculiar de DM autoimune de evolução mais arrastada, referida na literatura de língua inglesa como LADA (latent autoimmune diabetes of adulthood) (ROCHA, 2011).

A distinção entre LADA e DM tipo 2 baseia-se na detecção, nos pacientes com LADA, de anticorpos circulantes de ácido glutâmico, bem como de níveis sanguíneos mais baixos de peptídeo C (ROCHA, 2011).

✓ Patogênese das formas monogênicas de diabetes melito

Diabetes juvenil de início tardio (MODY – *maturity-onset diabetes of the young*) é um tipo raro da doença, que apresenta defeitos genéticos na função das células betas, por ausência de perda celular, herança autossômica dominante com alta penetrância, aparecimento precoce (em geral antes dos 25 anos e, eventualmente, no período neonatal) e ausência de autoanticorpos dirigidos contra células betas (VELHO, 2002).

Diabetes mitocondrial é causado por um defeito primário na função da célula beta que provoca redução na síntese de ATP mitocondrial, conseqüentemente na diminuição da secreção de insulina (ABBAS, 2005).

Diabetes associado a mutações no gene da insulina ou no receptor de insulina é uma alteração leve na maioria dos casos, já que esses pacientes são heterozigotos para a mutação. Nem as mutações no gene da insulina nem as do receptor contribuem significativamente para a incidência do diabetes tipo 2 (ABBAS, 2005).

### 2.3.3 COMPLICAÇÕES DO DIABETES

As principais complicações do DM de longa duração são decorrentes do comprometimento macrovascular e microvascular. A origem destas complicações é complexa, no entanto, pelo menos quanto à doença microvascular a hiperglicemia persistente constitui, por si mesma, uma espécie de mediador-chave, a ponto de justificar a manutenção dos níveis sanguíneos de HbA1c abaixo do nível crítico de 7% (BOULTON, 2005).

Quatro mecanismos estão relacionados na explicação dos efeitos deletérios da hiperglicemia sobre os vasos sanguíneos: O aumento da atividade da via dos polióis, a glicação não enzimática das proteínas com a produção dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), o estresse oxidativo, com o aumento dos radicais livres e as alterações da proteína kinase C e aumento da atividade da via metabólica das hexosaminas, com geração de uridina difosfato-N-acetilglicosamina e a resultante alteração na expressão de mediadores com TGF-Beta e PAI-1 (BOULTON, 2005).

Uma teoria unificadora recentemente foi proposta para integrar esses mecanismos, colocando como fator comum a superprodução de espécies reativas de oxigênio (em especial o ânion superóxido) pela cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias. Nesta teoria, as

espécies reativas de oxigênio lesam o DNA nuclear, com ativação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), enzima envolvida no processo de reparo do ácido nucleico danificado. A PARP inibe a atividade da enzima glicolítica GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), com aumento dos níveis de produtos intermediários que, por sua vez, ativam as quatro vias citadas acima (ABBAS, 2005).

Quando a concentração de glicose excede o limiar de reabsorção renal no diabetes melito tipo I, a hiperglicemia acompanha-se de glicosúria, diurese osmótica e poliúria, com perda de água e eletrólitos (ABBAS, 2005).

A depleção de água intracelular e a hiperosmolaridade decorrente dos altos níveis de glicose sanguínea estimulam os osmorreceptores dos centros cerebrais da sede, levando a polidipsia (ROCHA, 2011).

Por seu efeito sobre o cristalino, a hiperosmolaridade provoca borramento visual, reversível com a correção da hiperglicemia. O estado catabólico promove balanço energético negativo e, apesar do aumento do apetite (polifagia), observam-se perda muscular e diminuição do peso corporal (ROCHA, 2011).

Em consequência da hiperglicemia acentuada, ocorrem diurese osmótica e desidratação. Por outro lado, ativação da lipase lipoprotéica promove quebra das reservas adiposas e aumento dos níveis de ácidos graxos livres circulantes que, atingindo o fígado, são esterificados em acil-coenzima A (ROCHA, 2011).

Nas mitocôndrias, a oxidação da acil-coenzima A produz os chamados corpos cetônicos em ritmo que excede a capacidade dos tecidos utilizá-los como fonte de energia. Como resultado, desenvolvem-se cetonemia e cetonúria. Como a desidratação dificulta a excreção urinária dos corpos cetônicos, instala-se a acidose metabólica (ROCHA, 2011).

A liberação de aminoácidos cetogênicos pelo aumento do catabolismo protéico agrava o desarranjo metabólico. Além disso, a acidose metabólica pode acentuar-se pela má perfusão tecidual decorrente do colapso circulatório. A frequência respiratória aumenta, e as incursões respiratórias tornam-se mais profundas, configurando a chamada respiração de Kussmaul, ao passo que o hálito adquire o odor característico de acetona; com a progressiva deterioração do quadro clínico, sobrevêm o estado de torpor, seguido de coma (VELLOSO, 1995).

Tanto no DM tipo I quanto no DM tipo II, as complicações crônicas são mais devastadoras. Entre as complicações crônicas estão à aceleração da aterosclerose e as

complicações decorrentes da microangiopatia (nefropatia, neuropatia e retinopatia) (BOULTON, 2005).

A microalbuminúria é a primeira manifestação da nefropatia, que se não tratada poderá evoluir em 80% dos diabéticos tipo I e em 20 a 40% dos diabéticos tipo 2 para macroalbuminúria e insuficiência renal podendo levar o paciente ao tratamento de diálise e ou transplante renal (BOULTON, 2005).

A neuropatia manifesta-se mais frequentemente como polineuropatia simétrica distal sensitivo-motora dos membros inferiores, com nítido predomínio de distúrbio da sensibilidade (padrão em meia) (BOULTON, 2005).

A neuropatia autonômica, muito comum e quase sempre associada à polineuropatia simétrica distal, caracteriza-se por manifestações variadas como hipotensão ortostática, gastroparesia, episódios de diarreia noturna intercalados com constipação intestinal, disfunção erétil e esvaziamento incompleto da bexiga com predisposição a infecção urinária (BOULTON, 2005).

Os diabéticos são mais susceptíveis às infecções cutâneas, processos pneumônicos, pielonefrite e tuberculose. Nos diabéticos mal controlados, em especial se forem acometidos por neuropatia, e ou insuficiência vascular periférica, um processo infeccioso aparentemente banal de um artelho, pode deflagrar uma cascata de complicações potencialmente capazes de levá-los ao óbito ou, pelo menos, de exigir a amputação do membro atingido (ABBAS, 2005).

A maior susceptibilidade a infecções deve-se à diminuição da função dos neutrófilos (interferência na quimiotaxia, aderência ao endotélio, fagocitose e atividade microbicida, bem como a menor produção de citocinas pelos macrófagos) (ROCHA, 2011).

#### 2.3.4 DIABETES *MELLITUS* E INFECÇÃO

Diversos achados laboratoriais auxiliam na compreensão da associação entre DM e infecção. O paciente diabético apresenta depressão da atividade dos polimorfonucleares neutrófilos, diretamente relacionada aos níveis de hiperglicemia, demonstrando menor capacidade de fagocitose. Expressam também alteração na aderência, quimiotaxia e opsonização leucocitária - o sistema imune celular apresenta uma resposta ineficiente. E, por fim, alteração dos sistemas antioxidantes e menor produção de interleucinas (IL-2),

indispensáveis no processo inflamatório para uma resposta imunológica eficaz. Por outro lado, a função humoral parece estar preservada (ROCHA *et al*, 2002).

Pacientes com diabetes parecem ter um risco aumentado para bacteriúria assintomática e infecção do trato urinário, bem como infecção da pele e mucosas, incluindo infecções por *Candida* (MULLER *et al*, 2005).

Pavlović e colaboradores (2007) afirmam que diabéticos, frequentemente, apresentam algum tipo de lesão na pele que, geralmente, aparece logo após o desenvolvimento da doença, porém também podendo ocorrer como o primeiro sinal (PAVLOVIĆ, 2007).

Entre as lesões na pele, pode-se citar a lesão mais conhecida como pé diabético, que resulta da presença de neuropatia e/ou vasculopatia, sendo considerada uma complicação que piora a qualidade de vida do paciente, representando um importante fator de predisposição à presença de infecções (RODRIGUES *et al*, 2010).

Segundo o Consenso Internacional sobre Pé Diabético (2001), o pé diabético, de etiologia multifatorial, é caracterizado como uma das mais sérias e dispendiosas complicações do DM, sendo responsável por 40% a 70% das amputações das extremidades inferiores. Os portadores dessa condição clínica apresentam o risco 15 vezes maior de amputação (BONA *et al.*, 2010), porém com a higiene adequada do pé, o uso de meias e sapatos confortáveis, cuidados com as unhas, bem como evitar os pés descalços são medidas simples que podem impedir o surgimento de lesões (RODRIGUES *et al*, 2010).

De maneira geral, os pacientes com DM são reconhecidos como mais vulneráveis a uma série de complicações de natureza metabólica e/ou de origem infecciosa, como processos bacterianos, fúngicos e virais (MINELLI *et al*, 2003).

Diversas infecções superficiais causadas por fungos acometem mais frequentemente a população com DM (RODRIGUES *et al*, 2010). Entre as infecções fúngicas superficiais, destacam-se as freqüentes infecções ungueais (onicomicoses), que levam a relevantes alterações das unhas, podendo favorecer o aparecimento de infecções secundárias, como paroníquias (infecção da pele ao redor da unha) (MINELLI *et al*, 2003). Destaca-se, ainda, o intertrigo que se refere a qualquer lesão cutânea ocorrida em superfícies opostas em contato, como por exemplo, a região inguinal, axilas, região inframamária e dobras abdominais (RODRIGUES *et al*, 2010).

Infecções ungueais raramente causam sintomas ou desconforto (RODRIGUES *et al.*, 2010), e o longo período de tratamento com drogas antifúngicas, exige o cumprimento

rigoroso do paciente. Portanto, têm sido sugerindo que muitos pacientes com onicomicose sejam negligenciados e permaneçam sem tratamento. Porém, a subestimação de onicomicose em pacientes diabéticos pode conduzir a uma inflamação grave na derme e camada subcutânea da pele, bem como pode agir como um fator predisponente a úlceras nos pés (TAKEHARA *et al*, 2011).

O paciente com DM frequentemente é acometido por infecções cutâneas e sistêmicas. Muitas de suas doenças necessitam de diagnóstico e tratamento precoces para que sejam evitadas complicações ocasionalmente graves ou mesmo fatais (MINELLI *et al*, 2003).

## 2.4 INTERAÇÃO FUNGO X HOSPEDEIRO

A imunidade inata tem importante papel na defesa contra infecções fúngicas e consiste de componentes, tais como proteínas antimicrobiana, complemento, células fagocíticas com neutrófilos e macrófagos, células dendríticas, receptores *Toll-like* (TLR) e linfócitos de resposta inata. Na imunidade adquirida, tem importância à imunidade celular e anticorpos específicos (SANTOS, 2010).

**Células fagocíticas** - Fagócitos são células envolvidas ativamente nos processos defensivos do organismo, sendo altamente especializados em fagocitose, digestão intracelular e capacidade de matar microrganismos e células. São divididos em dois grupos: (1) fagócitos polimornucleares, representados por neutrófilos e eosinófilos. Ambos originam-se na medula óssea a partir de mieolastos e são encontrados circulando no sangue, aderidos à parede vascular ou migrados nos tecidos; (2) fagócitos monucleares ou macrófagos, originados de monócitos circulantes, que por sua vez derivam de monoblastos da medula óssea. Quando migram para os tecidos, os monócitos passam a constituir os macrófagos, fixos ou livres, que recebem nomes diferentes conforme sua localização. Há também as células dendríticas, cujos precursores originam-se na medula óssea e migram para os tecidos nas primeiras fases da inflamação, onde passam a exercer papel de endocitose, processamento e apresentação de antígenos (PEREIRA, 2011; ABBAS, 2005).

**Neutrófilos** - os polimorfonucleares neutrófilos (PMN) maduros medem 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos; no citoplasma, contêm

grânulos (cerca de 600 por célula) de dois tipos: (a) grânulos azurófilos (10 a 20 % do total), peroxidase positivos, com ou sem defensinas; (b) grânulos específicos, peroxidase negativos, com um grupo rico em gelatinase e outro rico em lactoferrina. Além de grânulos, os neutrófilos possuem vesículas secretoras com várias integrinas, receptores diversos (para peptídeos formilados, ativador do plasminogênio, C1), os quais são expostos na sua superfície no momento da desgranulação. Os neutrófilos são muito importantes na fagocitose e na eliminação de microrganismos, sobretudo bactérias, desempenhando papel fundamental no primeiro combate de neutrófilos circulantes abaixo de 1.000 células/mm<sup>3</sup> têm quadros muito graves de septicemia, que se desenvolve em poucas horas (ABBAS, 2005).

A primeira fase da granulocitopoese é estimulada por IL-1 e TNF- $\alpha$ , e dura 5 dias. A fase de maturação leva cerca de 10 dias. Na circulação, os PMN permanecem por cerca de 8 horas, após os que migram para os tecidos. Metade dos PMN na circulação fica aderida à parede vascular. Adrenalina, exercício físico e corticosteróides aumentam o número de PMN circulantes por removê-los da parede vascular. Ao contrário, lipopolissacarídeos aumentam a adesividade dos PMN à parede dos vasos, por estimularem a expressão de moléculas de adesão ao endotélio (PEREIRA, 2011).

Os neutrófilos são ricos em receptores para quimiocinas CXCL 1 a 8 (grupo ERG) e para outros quimiotáticos gerados a partir do complemento, fibrinólise e ácidos graxos, razão pela qual representam as células mais numerosas na fase inicial de inflamações (PEREIRA, 2011).

**Macrófagos** - As características e propriedades dos macrófagos variam não só de acordo com sua localização como também com seu estado funcional. Quando estimulados os monócitos deixam a circulação guiados por um fator quimiotático (quimiocinas CCL 2, 3, 4, 7 e 8) e acumulam-se no local do estímulo. Saído da circulação os monócitos passam a ser denominados de macrófagos e apresentam modificações fenotípicas e funcionais, induzidas por mediadores para os quais possuem receptores: São maiores, têm grânulos e maior capacidade de aderir ao vidro, de espalhar-se e de fagocitar, pinocitar, de digerir, de liberar óxido nítrico e radicais derivados de O<sub>2</sub> e de secretar enzimas, especialmente metaloproteases, passando a ser chamados macrófagos solicitados ou exsudados (PEREIRA, 2011).

Nas fases iniciais do processo inflamatório e em inflamações crônicas, os macrófagos são ativados via TLR (toll-like receptor) e receptores de citocinas pró-inflamatórias. A

ativação é dirigida para aumentar seu poder defensivo, expresso pela capacidade de fagocitar e de matar microrganismos e células cancerosas e de produzir e excretar citocinas pró-inflamatórias. Estes macrófagos ativados são do tipo M1. Na resolução e nos processos de remoção e reparo dos tecidos lesados são chamados de macrófagos do tipo M2. Muitas evidências mostram que ativação dos macrófagos é absolutamente inespecífica; experimentos com populações puras dessas células mostram que macrófagos ativados por *T. Gondii* têm capacidade aumentada de matar outros microrganismos intracelulares, como *L. monocytogenes* e *M. Tuberculosis* (ABBAS, 2005).

**Células dendríticas** localizadas estrategicamente próximo à entrada dos patógenos, as células dendríticas têm capacidade tanto de capturar antígenos como de alcançar os órgãos linfóides secundários e ativar as células T helper e citotóxico. Sofrem maturação sob influência de patógenos, evoluindo com maior expressão de moléculas coestimulatórias, produção de citocinas como IL2 e expressão alterada de receptores de quimiocina. Influenciam a produção de citocinas por células T, e, portanto, a resposta final aos microrganismos, comportando-se como elo de ligação entre a imunidade inata e a adquirida. É, pois, fundamental o conhecimento de suas funções para explorar seu emprego com finalidades terapêuticas ou profiláticas (ABBAS, 2005; YASUDA, 2010).

Uma importante característica das células dendríticas é a sua capacidade de discriminar leveduras de hifas de *Candida albicans*, gerando respostas imunes distintas. Entretanto as hifas não permanecem no interior do fagossoma e foram encontradas livres no citoplasma. Nos ensaios *in vivo*, a imunidade protetora contra fungos foi suscitada pela injeção de células dendríticas pulsadas com leveduras de *C. Albicans*, mas não com hifas. Em associação à capacidade de discriminar entre ambas as formas fúngicas, estas células podem também atuar como reguladores centrais da reatividade de linfócitos T no saprofitismo e nas infecções causadas por *C. Albicans*. Estudos semelhantes foram realizado para a resposta aos conídios e hifas de *A. Fumigatus*, obtendo respostas diferentes pelas células dendríticas, sugerindo que os fungos de um modo geral utilizam vias comuns de entrada nas células dendríticas, fornecendo novas direções no estudo do papel chave dessas células na regulação da resposta imune antifúngica (YASUDA, 2010).

As doenças micóticas, principalmente as crônicas e sistêmicas ocorrem, certamente sob circunstâncias peculiares. Estas doenças manifestam-se apenas quando ocorre alteração no mecanismo da imunidade, congênitos, adquiridos ou mediados por tratamento com

imunossupressores, bem como na presença de doenças de base, tais como diabetes, linfomas, particularmente na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) (YASUDA, 2010).

As doenças causadas por fungos podem ser superficiais ou sistêmicas, ocorrendo como infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos. As infecções dermatofíticas geralmente são superficiais, podendo acometer pele, mucosas, unhas e cabelos (LEVINSON, 2010).

A invasão de tecidos profundos e a disseminação da doença teve sua frequência aumentada com o advento dos transplantes, da síndrome de imunodeficiência adquirida e de outras condições de imunodepressão já citadas (YASUDA, 2010).

As infecções sistêmicas têm na imunidade celular, via macrófago ativado, o mecanismo protetor mais eficiente, podendo ocorrer alteração de mecanismos imunoreguladores de linfócito B, provocando aumento da produção de anticorpos. A resolução da doença pode conferir imunidade específica (YASUDA, 2010).

As infecções oportunistas são produzidas por agentes ubíquitosos, assumindo grande importância nos imunodeprimidos, pacientes com neutropenia e com depressão da imunidade celular. A instalação da doença é facilitada por uso de drogas imunodepressoras na terapêutica de neoplasias, transplantes e doenças autoimunes. O neutrófilo representa a célula efetora da proteção antifúngica oportunista, não havendo resistência específica aos microrganismos após resolução da doença (LEVINSON, 2010).

Os fatores que regulam a interação do hospedeiro com o agente micótico são bastante complexos. Nas infecções dermatofíticas as lesões são superficiais, podendo acometer pele, mucosas, unhas e cabelos. Contudo, a invasão de tecidos profundos e a disseminação da doença, antes detectada raramente, teve sua frequência aumentada com o advento dos transplantes (renal e medula), da AIDS, aumento da expectativa de vida e do expressivo crescimento do número de novos casos de diabetes (LEVINSON, 2010).

A pele com seu epitélio queratinizado possui uma superfície firme, geralmente seca, que atua como uma barreira mecânica e impede a invasão micótica tanto para dermatófitos quanto *Candida* pela contínua descamação, que elimina persistentemente tais microrganismos. A maceração ou o trauma são necessários para a penetração epidérmica, sendo a umidade um importante fator na infecção por dermatófitos e *Candida* em regiões interdigitais. Tais fungos encontram na pele o primeiro obstáculo para a colonização; devido

ao processo de descamação contínua, tal colonização é persistentemente rechaçada (LEVINSON, 2010).

No que se refere às mucosas, seu revestimento epitelial possui mecanismos diferentes que impedem ou retardam a colonização. O revestimento epitelial das mucosas utiliza a presença de muco e o movimento ciliar, importante no trato respiratório para eliminar partículas do tamanho de uma levedura, sendo prejudicados durante a anestesia prolongada e doenças debilitantes (YASUDA, 2010).

Os dermatófitos induzem na pele uma resposta imune mediada tanto por células como por anticorpos. A liberação de substâncias mediadoras da inflamação causa dano tissular e formação de eczema na pele que circunda a área afetada (YASUDA, 2010).

A fagocitose cumpre um papel importante na defesa contra os agentes micóticos. Em condições normais, a maioria dos esporos de fungos que penetram num hospedeiro cujo sistema defensor está intacto. É ingerida e degradada por polimorfonucleares, monócitos circulantes e macrófagos tissulares. A fagocitose é um processo inespecífico, porém seus efeitos são controlados e ampliados pela resposta imune do hospedeiro (PEREIRA, 2011; YASUDA, 2010).

Uma vez no interior dos tecidos, as células fagocíticas migram direcionalmente por meio de um gradiente de concentração de mediadores inflamatórios, em um fenômeno chamado de quimiotaxia. O fenômeno depende da existência, nos leucócitos, de moléculas de actina e miosina, que associam e dissociam rapidamente na dependência de  $Ca^{++}$  e outras proteínas, entre as quais a calmodulina (FRANCO, 2011).

A morte do agente ou a degradação da partícula fagocitada depende de dois tipos de fenômenos:

-Mecanismo dependente de  $O_2$  – A fagocitose ativa a NADPH-oxidase. A ativação leva ao aumento do consumo de oxigênio com ativação do shunt da hexosemonofosfato. A NADPH-oxidase diminui o oxigênio molecular ao anion superóxido ( $O_2^-$ ), que, reduzido a  $H_2O_2$ , é microbicida. Nos grânulos dos neutrófilos e macrófagos, existe outra enzima, a mieloperoxidase, que, em presença de cloro, converte o  $H_2O_2$  em  $HOCl$ , um poderoso oxidante com maior poder microbicida (ABBAS, 2005).

-Mecanismo independente de  $O_2$ - A ação microbicida na ausência de oxigênio depende de outras substâncias encontradas nos grânulos dos leucócitos, entre as quais a lisozima, proteína que aumenta a permeabilidade dos microrganismos. Essa enzima hidrolisa

a ligação entre o ácido murâmico-N-acetil-glucosamina, encontrado na capa glicoproteica das bactérias, e a lactoferrina, captadora de ferro (ABBAS, 2005).

### 3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Associar o polimorfismo G-463A do gene da mieloperoxidase à susceptibilidade dos pacientes diabéticos em desenvolver infecção fúngica superficial.

Objetivos Específicos:

- Isolar fungos de escamas ungueais de pacientes portadores de *diabetes mellitus* e identificar os agentes etiológicos das micoses;
- Avaliar a glicemia e a hemoglobina glicosilada dos diabéticos;
- Determinar as espécies mais prevalentes;
- Detectar o polimorfismo G-463 A do gene da MPO e associar com a susceptibilidade às infecções fúngicas nos pacientes com *diabetes mellitus*.



# MATERIAL E MÉTODOS



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo utilizamos os seguintes preceitos e adotamos rigorosamente os métodos para atingir os objetivos finais.

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Em todo o estudo foi seguido os preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Saúde da Resolução 196/96 que regulamenta as diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos.

O projeto correspondente deste trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Pernambuco para apreciação e parecer, tendo sido aprovado em 10/04/2012 de nº 62/2011 – CAAE 0042.0.447.000-11.

Após aprovação, bem como após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídos no estudo 66 pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) atendidos para consulta de rotina no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Referência para Diabetes Ermírio de Moraes, no setor de Endocrinologia Clínica, Recife, Brasil, o qual emitiu carta de anuência permitindo o estudo (ANEXO A).

Todos os pacientes foram convidados para participar do estudo, o qual foi explicado detalhadamente a cada um deles o propósito da pesquisa, e os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo). É importante ressaltar que as informações, de caráter pessoal, são absolutamente sigilosas e não serão divulgadas em caso de publicações.

Foi esclarecido aos pacientes que os mesmos terão acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Os pacientes tiveram seu direito garantido de obter os resultados dos exames realizados, assim como, terão o resultado final desta pesquisa se assim desejar.

As coletas foram realizadas em ambiente hospitalar, dentro das normas de segurança e em acompanhamento médico, devendo ser enfatizado que não houve nenhum tipo de complicação durante ou pós-procedimento.

Os benefícios que esta pesquisa propõe para os pacientes é o diagnóstico de possíveis infecções micóticas, possibilitando tratamento específico.

Devemos também ressaltar que estas pacientes estão contribuindo diretamente para o desenvolvimento científico e o progresso da ciência.

#### 4.2 LOCAL DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado no Centro Médico Senador José Ermírio de Moraes que fica situado na Av. 17 de Agosto nº 2388, Casa Forte, Recife-PE, CEP: 52061540 e no Laboratório de Hematologia do Laboratório Central (LABCEN) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

**Critérios de Inclusão:** Pacientes com diabetes *mellitus* tipo II, atendidos no ambulatório do Centro Médico Senador José Ermírio de Moraes, que apresentem lesão clínica com suspeita diagnóstica de infecção fúngica e que concordarem em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Critérios de Exclusão:** Foram excluídos do presente estudo, pacientes diabéticos tipo II em tratamento para lesão fúngica e pacientes que não concordarem em participar da pesquisa.

#### 4.4 PERÍODO DE REALIZAÇÃO

A Coleta do material foi realizada no período de Junho de 2012 a Novembro de 2012.

#### 4.5 DESENHO DO ESTUDO

É um estudo prospectivo e analítico realizado por meio do material coletado e dados provenientes dos prontuários das pacientes.

#### 4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Foram avaliados os seguintes parâmetros: sexo, idade, sítios anatômicos acometidos, agentes etiológicos identificados, glicemia, hemoglobina glicada.

Dependentes: Glicemia, Hemoglobina Glicada,

Independentes: Idade, Sexo, Local da lesão.

#### 4.7 MÉTODOS DE COLETA

✓ Obtenção das amostras clínicas:

Após aprovação pelo Comitê de Ética, o procedimento para obtenção das amostras clínicas foi iniciado e realizado de acordo com a localização da lesão. Amostras clínicas como sangue e raspado ungueal foram coletados pelo pesquisador do referido centro de saúde.

Escamas ungueais foram obtidas por escarificação da região, com auxílio de um bisturi e placa de Petri, previamente esterilizados.

✓ Manipulação das amostras clínicas:

Após a obtenção das amostras, foram preparadas lâminas para realização do exame direto. Quando necessário, foram clarificadas com solução aquosa 20% de hidróxido de potássio (KOH), coradas com Giemsa ou contrastadas com tinta Nankin. Concomitantemente, foram semeadas na superfície do meio ágar Sabouraud e ágar *BHI* (Brain Heart Infusion) adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas a 30°C e a 37°C por um período de até 20 dias. Após o surgimento dos fungos, estes foram purificados e em seguida, identificados.

✓ Purificação das culturas:

Foram colocados fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol. Desta suspensão, 0,2 mL foram semeados na superfície do meio Ágar Sabouraud com antibiótico contido em placas de Petri. As colônias foram repicadas

para tubos de ensaio contendo meio específico, de acordo com o fungo isolado para posterior identificação.

✓ Identificação dos agentes etiológicos:

Após serem obtidas culturas puras, estas foram identificadas de acordo com as características macroscópicas (bordos, textura, coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas) e, quando necessário, fisiológicas e bioquímicas (assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono, produção de urease e ácido acético) (De Hoog *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000; Kreger-Van Rij, 1984; Lacaz *et al.*, 2002).

✓ Avaliação da glicemia e hemoglobina glicosilada:

Foram avaliados glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada da população de estudo, utilizando o método da glicose oxidase para a glicose e o método de cromatografia por troca iônica para a hemoglobina glicosilada, através do equipamento automatizado de análise bioquímica Olympus-AU400e.

✓ Seleção do grupo para estudo do gene MPO:

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção venosa, em tubos à vácuo do tipo Vacutainer®, de pacientes diabéticos com infecção micótica para controle do gene *MPO*. Foram utilizados pacientes portadores de diabetes atendidos no mesmo serviço de saúde, sem micose, pareados em sexo e idade em relação aos pacientes, escolhidos aleatoriamente na população. Como controle sadio foi utilizado um banco de DNA existente no setor de Hematologia do Laboratório Central (LABCEN) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

### **Extração de DNA**

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmico modificado. O sangue foi contrifugado a 2200 rpm durante 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. A seguir a solução denominada TKM1 ( $\text{Tris-HCl}$  10 $\mu\text{M}$  pH=7,6;  $\text{KCl}$  10 $\mu\text{M}$ ;  $\text{MgCl}_2$  10 $\mu\text{M}$  e EDTA

20µM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100µl de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas novamente a 2200 rpm por 10 minutos e posteriormente o sobrenadante descartado, obtendo-se o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400µl da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH=7,6; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; NaCl 0,4 M e EDTA 20mM) e 25µl de SDS 10% e incubado a 55° C durante 30 minutos. Após esse período, 180µl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos na microcentrífuga e o sobrenadante transferido para outro tubo de eppendorf, adicionando-se a ele um 400µl de clorofórmio/álcool isomílico e 400µl de fenol saturado, seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. À mistura adicionou-se 800µl de clorofórmio/álcool isoamílico e foi novamente centrifugada transferindo o sobrenadante à outro eppendorf. Acetato de sódio 3M pH=5,3 e etanol absoluto gelado foram postos no tubo para a precipitação do DNA, sendo novamente centrifugada transferindo e o “pellet” lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, sendo quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA).

## **Análise molecular**

### **Reação de Amplificação PCR**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica, *in vitro*, para amplificação de DNA. A reação catalisada pela Taq polimerase, utilizada primers que hibridizam-se em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flaqueiam a sequência a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelando a extensão dos primers, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento.

### **Deteção do Polimorfismo G463A do gene MPO**

A deteção do polimorfismo 463 (G/A) no gene da MPO foi realizada a técnica de PCR com posterior análise de restrição (RFLP). A PCR foi seguida utilizando DNA 100-500ng, primers 0,24µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Tris-HCl 50µM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 20mM, Taq polimerase 0,04U/µL, H<sub>2</sub>O qsp 50µL, nas condições descritas na Tabela 1. O desenho dos primers foi forward 5´- CGGTATAGGCACACACAATGGTGAG – 3´ e reverse 5´ - GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC – 3´.

**Tabela 2:** Condições da reação para amplificação do polimorfismo do gene MPO.

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento 35 ciclos		Extensão		Extensão Final	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
463(G-A)	94	5'	94	30"	56	30"	72	1'	72	7'

T: Temperatura.

A análise qualitativa do DNA amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% pela evidenciação de uma banda de 350pb. Após amplificação da região de interesse, foi realizada análise de restrição com endonuclease específica *Acil*, permitindo a detecção do polimorfismo por eletroforese em gel de agarose 3,0%.

#### **Análise de restrição – *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)***

O produto da PCR foi digerido a 37° C overnight (16 horas), com enzima *Acil*. O produto digerido foi separado por eletroforese e analisado em gel de agarose 1000 a 3,0% (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), marcado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador à luz ultravioleta.

Como controle foram utilizados amostras de indivíduos homozigotos, heterozigotos e normal para indivíduos com polimorfismo G463A do gene MPO.

#### **4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados deste estudo foram analisados pelo pesquisador, em conjunto com um estatístico e orientador da pesquisa, utilizando estatística descritiva e análise inferencial, utilizando um *Software* específico para a finalidade.

O Software utilizado para a análise estatística descritiva e inferencial foi o **R Studio** Versão 0.97.248, **Plataforma R** versão 2.15.2 (2012-10-26) e ISBN 3-900051-07-0.

Neste estudo, foram realizadas análises descritivas das variáveis em questão de maneira preliminar, dos 66 pacientes estudados. Após a análise descritiva da base de dados, seguiu-se com a análise inferencial. Neste ponto procurou-se verificar se poderíamos tirar algumas conclusões estatisticamente significativas dos dados, ou seja, se a partir da amostra poderíamos obter informações acerca da população em geral. Para isso, foram utilizados os

testes estatísticos: Coeficiente de Correlação de Pearson, Teste X<sup>2</sup> de Comparação de Proporções, Teste X<sup>2</sup> de Associação ou Independência e Teste Exato de Fisher.

## 5. RESULTADOS

Nossos resultados estão apresentados na forma de dois artigos:

5.1 Primeiro artigo: Abordagem clínica no diabetes tipo2 associada à onicomicose. Será submetido à revista *The Journal Infectious Diseases*, fator de impacto de 5,848 e Qualis A1 em Medicina II.

5.2 Segundo artigo: Frequência do Polimorfismo G463A MPO em Diabéticos com Onicomicose. Será submetido à revista *Journal of Endocrinology*, fator de impacto de 4,058 e Qualis A2 em Medicina II.



# ARTIGO 1



## 5.1 ARTIGO 1

**Título:** Abordagem clínica no diabetes tipo2 associada à onicomicose

**Resumo:** O Diabetes Mellitus tipo 2 é uma doença de grande prevalência e alta mortalidade em todo o mundo. A persistência da hiperglicemia no curso da doença está envolvida com padrões clássicos de nefropatia, retinopatia e neuropatia. Tais complicações associadas a maior susceptibilidade dos diabéticos em desenvolverem infecções, agravam mais ainda a qualidade de vida destes pacientes. As infecções fúngicas mais frequentes em pacientes diabéticos correspondem às onicomicoses. Em nosso trabalho a frequência das onicomicoses foi determinada em 66 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, atendidos no Centro de Referência para Diabetes Ermírio de Moraes, na cidade do Recife, durante o período de junho a novembro de 2013. Todos os 66 pacientes com Diabetes tipo 2 apresentaram algum sinal clínico para onicomicoses. Destes 24 (36,3%) revelaram confirmação para etiologia fúngica, destacando-se *Candida krusei* (45,8%) como uma das espécies mais frequentes. Taxas de glicemia e hemoglobina glicosilada estiveram elevadas em 37,5% dos pacientes com micoses.

**Palavras chave:** Diabetes Mellitus, Candida, Onicomicoses.

## Abstract

Diabetes mellitus type 2, is a disease with high prevalence and high mortality worldwide. The persistence of hyperglycemia in the disease course is observed with classic patterns of nephropathy, retinopathy and neuropathy. Such complications associated with increased susceptibility of diabetic patients are known to develop infections, which aggravate further the quality of life of these patients. Fungal infections, more frequently in diabetic patients, correspond to onychomycosis. In the study conducted at the Reference Center for Diabetes Ermírio de Moraes, in Recife. The frequency of occurrences during the period June to November 2013, demonstrated that all 66 patients with type 2 diabetes showed clinical signs for onychomycosis. Of these, 24 (36.3%) revealed confirmation for fungal etiology, especially *Candida krusei* (45.8%) as one of the most frequent species. Rates of glucose and glycated hemoglobin were elevated in 37.5% of patients with mycosis.

**Keywords:** Onychomycosis, *Candida*, Diabetes Mellitus.

## **Introdução**

O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. A crescente incidência é atribuída ao envelhecimento populacional, aos avanços terapêuticos no tratamento da doença, mas, especialmente, ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal [9].

Esta condição clínica, por se tratar de uma doença sistêmica, apresenta uma série de complicações, incluindo a doença cardiovascular, a qual aparece como sendo a primeira causa de mortalidade; a retinopatia representa a principal causa de cegueira adquirida e a nefropatia uma das maiores responsáveis pelo ingresso à diálise e transplante; além do pé diabético que constitui importante causa de amputações de membros inferiores [9].

Acrescenta-se às inúmeras complicações relacionadas ao DM, a sua alta incidência em todo mundo. Dados publicados pela Universidade de Edimburgo [19], sobre uma estimativa e projeção da quantidade de doentes entre os anos de 2000 e 2030, mostra que em 1995, a quantidade de doentes era de 135 milhões, em 2005 esse número passou para 240 milhões, e a projeção é que em 2030 atinja a marca de 366 milhões de pessoas, estando dois terços desse número, se tratando de habitantes de países em desenvolvimento. No Brasil, a quantidade estimada de portadores de DM é em torno de 10,3 milhões, de acordo com estudos realizados sobre o custo da doença em países da América Latina [3].

O paciente diabético, comumente, está mais propenso ao desenvolvimento de infecções, sejam elas bacterianas, fúngicas ou virais. Há um risco de 30 a 40% maior dos diabéticos desenvolverem infecções do trato respiratório inferior, do trato urinário, da pele e mucosas. Sabe-se também que algumas infecções são mais frequentes em pacientes diabéticos e outras são exclusivas destes [14, 17].

O pé diabético está relacionado ao curso clínico desta doença, sendo considerado responsável por mais de 50% das amputações de extremidades, não decorrentes de trauma. Estima-se ainda que cerca de 35% a 40% dos pacientes diabéticos com úlceras nos pés sofrerão amputação num período de 3 anos. Dentre os fatores que levam a essa importante predisposição dos diabéticos à amputações, destacam-se traumas de sapatos com formação de úlceras e abrasões não percebidas devido à neuropatias (dentre a população de diabéticos, 25% em média apresentam neuropatia), presença de onicomicoses e dermatomicoses [15].

Em seu estágio inicial as infecções fúngicas favorecem o aparecimento de prurido, eritema e maceração em várias regiões, sobretudo os dedos. Contudo, podem gerar consequências potencialmente graves, facilitando o aparecimento e a evolução de infecções bacterianas [10,14].

Assim, no diabetes, a onicomicose é uma condição clínica que deve ser diagnosticada e tratada precocemente por contribuir para o desenvolvimento de infecções secundárias. Ainda, o tratamento local ou sistêmico é prolongado e os efeitos tóxicos limitam o uso de antifúngicos. Assim, o estudo tem como objetivo avaliar a frequência de onicomicoses em pacientes diabéticos tipo 2 associada as condições clínicas [8,2,14].

## **Materiais e Métodos**

Foram incluídos no estudo 66 pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) atendidos para consulta de rotina no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Referência para Diabetes Ermírio de Moraes, no setor de Endocrinologia Clínica, Recife, Brasil.

O estudo foi desenvolvido no período entre junho de 2012 e novembro de 2012. Os pacientes foram incluídos no estudo somente após aprovação do Comitê de Ética, com registro nº 62/2011 (CAAE: 0042.0.447.000-11), bem como após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os pacientes foram avaliados quanto às lesões sugestivas de micoses, as quais foram coletadas em condições adequadas (antisepsia com álcool a 70%), com auxílio de bisturi e placa de Petri esterilizados.

As amostras clínicas foram clarificadas com hidróxido de potássio a 20% (KOH) para hidrólise da queratina e detritos, facilitando a observação através de microscopia direta de elementos fúngicos. Para a cultura, as amostras foram inoculadas em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) com cloranfenicol (50 mg/L) contido em placas de Petri, incubadas a 30°C. O crescimento das culturas foi acompanhado durante 15 dias e as colônias puras transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud, mantidas a temperatura de 30°C por 15 dias e identificadas segundo critérios taxonômicos clássicos e moleculares [4,6].

Foram avaliados glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada da população de estudo, utilizando o método da glicose oxidase para a glicose e o método de cromatografia por troca

iônica para a hemoglobina glicosilada, através do equipamento automatizado de análise bioquímica Olympus-AU400e.

## Resultados

Do total de 66 pacientes examinados, 22 eram homens e 44 mulheres, com média de 64,2 anos (Tabela 1). Houve confirmação micológica de onicomicose através da microscopia direta e cultura em 24(36,4%) pacientes, sendo 7 homens e 17 mulheres acometidos por onicomicose.

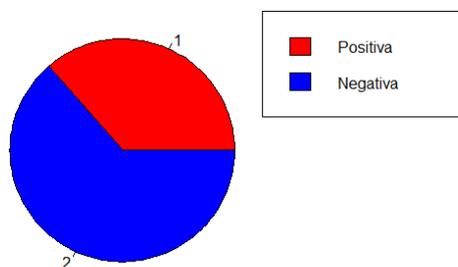
Ao exame direto das escamas ungueais dos pacientes com a infecção fúngica, foram visualizadas várias células de leveduras hialinas e/ou pseudomicélio e micélio fúngico verdadeiro (figura 1). Os agentes etiológicos identificados foram *Candida krusei* (45,8%), *Candida albicans* (29,2%), *Candida sp* (20,8%) e *Candida lusitaniae* (4,2%)

Do total de 66 pacientes, 50 apresentaram glicemia de jejum acima de 99 mg/dL e, destes, 20 tiveram cultura positiva para fungo, 25 apresentaram hemoglobina glicosilada acima de 8,3 e, destes, 8 tiveram cultura positiva para fungo (Figura 2).

Dos 24 pacientes que tiveram confirmação na cultura para fungo, 9 apresentaram tanto a glicemia de jejum quanto a hemoglobina glicosilada com níveis acima de 99 mg/dL e 8,3, respectivamente (Figura 3).

**Gráfico 1** – Gráfico do resultado das Culturas de Fungo

Gráfico da Proporção do resultado das Culturas



**Tabela 1:** Teste de Associação e de Comparação de Proporções entre Faixas Etárias e Cultura

CULTURA	IDADE				TOTAL
	< 58	58 > x < 64	64 > x > 71	> 71	
Positivo	6	8	5	5	24
Negativo	12	11	8	11	42
Total	18	19	13	16	66
Proporção das culturas positivas	27%	42%	32%	31%	Não se aplica

p-valor Teste de Fisher	p-valor Teste do X <sup>2</sup> de associação	p-valor Teste do X <sup>2</sup> de comparação de proporções
0.9283	0.9083	0.9083

**Tabela 2:** Teste de Associação e de Comparação de Proporções entre Glicemia e Cultura

CULTURA	GLICEMIA			TOTAL
	< = 99	100 - 200	> 200	
Positivo	4	8	12	24
Negativo	12	12	18	42
Total	16	20	30	66
Proporção das culturas positivas	25%	40%	40%	Não se aplica

p-valor Teste de Fisher	p-valor Teste do X <sup>2</sup> de associação	p-valor Teste do X <sup>2</sup> de comparação de proporções
0.5769	0.5547	0.5547

**Tabela 3:** Teste de Associação e de Comparação de Proporções entre Hemoglobina e Cultura

CULTURA	HEMOGLOBINA			TOTAL
	< = 8.3	> 8.3 - 9	> 9	
Positivo	15	3	6	24
Negativo	26	3	13	42
TOTAL	41	6	19	66
Proporções das culturas positivas	36%	50%	31%	Não se aplica

p-valor Teste de Fisher	p-valor Teste de X <sup>2</sup> de associação	p-valor Teste do X <sup>2</sup> de comparação de proporções
0.7352	0.715	0.715

## Discussão

Estudos sobre a prevalência de infecções fúngicas nos diabéticos iniciaram na década de 70. Alteras e Saryt investigaram a prevalência de onicomicoses por dermatófitos e *Candida* em 100 diabéticos e 100 não diabéticos. Na microscopia direta isolaram fungos nas amostras clínicas de 70 diabéticos e em 53 controles. A cultura foi positiva em 57 e 40 para, respectivamente, diabéticos e controles. Os fungos mais encontrados foram *Trichophyton rubrum* nos dois grupos comparados. Estes resultados levantaram a hipótese de que havia relação entre infecções fúngicas por dermatófitos e *Candida*, e níveis elevados de açúcar sanguíneo, pois, estes diabéticos apresentavam taxa de glicose acima de 300 mg/dL [1].

Por outro lado, Lugo-Somolinos e colaboradores excluíram a possibilidade desta relação quando analisaram também 100 pacientes diabéticos e 100 controles, e obtiveram um resultado de infecção fúngica de 31% para diabéticos e 33% para o grupo controle. A doença mais frequente foi a tinea pedis (16 casos), onicomicoses (6 casos) e tinnea cruris (2 casos). O fungo mais frequente foi também *T. rubrum*, seguido por *T. mentagrophytes* e *Candida* [16].

Gupta e colaboradores encontram em uma pesquisa multicêntrica com 550 diabéticos, uma correlação significativa entre onicomicose, gênero e idade. Histórico familiar de onicomicose, doença vascular periférica e uso de drogas imunossupressoras, foram inclusos como fatores predisponentes. Encontraram, ainda, um risco de 2,77 vezes maior de chance dos diabéticos contraírem onicomicoses do que indivíduos sem diabetes. Os agentes mais frequentes achados nesta mesma pesquisa foram os *T. rubrum* e *T. Methagrophytes* [12].

A frequência de onicomicoses de 34,6% encontrada no nosso estudo foi similar a encontrada em várias outras pesquisas [2,5], embora, sejam raros os relatos que avaliem a prevalência de onicomicoses no diabetes. A média de idade foi acima da sexta década, ocorrência muito repetida por outros trabalhos.

O predomínio da *Candida krusei* como o agente infeccioso mais frequente, revelou um painel diferente do encontrado na maioria das publicações, onde mostraram os dermatófitos como os agentes fúngicos mais prevalentes, sobretudo os *Trichophyton rubrum* [11]. Alguns autores questionam o papel das leveduras como agentes patógenos nas onicomicoses, por defenderem que estas atuam apenas como contaminantes ou colonizadores de unhas já infectadas por dermatófitos [7].

As taxas sanguíneas elevadas da glicose e da hemoglobina glicosilada demonstraram que as pessoas envolvidas no estudo não apresentavam um controle rigoroso da glicose. A

grande associação de onicomicoses a pacientes com esse perfil no nosso estudo, é um achado comum na literatura, contudo, permanecem muitas controvérsias.

Existem diferenças geográficas na epidemiologia e etiologia das onicomicoses, especialmente na frequência de cada grupo de fungos responsável pela infecção. *T. rubrum* é a espécie mais frequente na Inglaterra, Alemanha, no Canadá, nos EUA e Índia, enquanto a alta prevalência de *Candida spp.* na unha tem sido relatada na Bélgica, Arábia Saudita e Espanha. Em outras regiões tropicais do mundo, a etiologia das onicomicoses também pode ser atribuída ao *Scytalidium spp.*, fungo filamentosos não dermatófito [18].

## Referências

1. Alteras I, Saryt E. Prevalence of pathogenic fungi in the toewebs and toenails of diabetic patients. *Mycopathologia*. 1979 Jul 16;67(3):157-9.
2. Araújo AJG, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. In: *An Bras Dermatol*; 2003 maio/jun; Rio de Janeiro, Brasil. 2003;73(3):299-308 208.
3. Barcelò A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. The cost of diabetes in Latin America and Caribbean: *Bull World Helth Organ* 2003;81(1): 19-27.
4. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. *J Gen Microbiol*. 2000 Jun;128(6):1265-77.
5. Bouguerra R, Essais O, Sebaï N, Ben Salem L, Amari H, Kammoun MR, Chaker E, Zidi B, Ben Slama C. Prevalence and clinical aspects of superficial mycosis in hospitalized diabetic patients in Tunisia. *Med Mal Infect*. 2004 May;34(5):201-5.
6. De Hoog, G.S., Guarro, J. Gené, J. Figueras, M J. Atlas of Clinical Fungi. 2.ed. Amer Society for Microbiology, 2000. 1126p.
7. Ellis DH, Watson AB, Marley JE, Williams TG. Non-dermatophytes in onychomycosis of the toenails. *Br J Dermatol*. 1997 Apr;136(4):490-3.

8. Ferrándiz C, Pujol R M, Garcia-Patos Vet al. Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J Am Acad Dermatol*. 2002 Jun;46(6):867-73.
9. Ferreira S, Gouveia R. Aspectos epidemiológicos do Diabetes Mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade. *Diabetes na prática clínica 2012*. [Acesso em 06 de Fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-1/2-aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>.
10. Foss, NT, Polon DP, Takada MH et al. Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. *Rev Saude Publica*. 2005 Aug;39(4):677-82.
11. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW et al. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicentre Canadian survey of 15,000 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Aug;43(2 Pt 1):244-8.
12. Gupta AK, Konnikov N. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. *Br J Dermatol*. 1998 Oct;139(4):665-71.
13. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1103p.
14. Lewi DS. Infecções no Paciente diabético. *Diabetes na prática clínica – Capítulo 10 - Infecções no paciente diabético*. *Diabetes na prática clínica*. [Acesso em: 07 de Fevereiro de 2013]. Disponível em: < <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-2/20-infeccoes-no-paciente-diabetico>>.
15. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis*. 1997 Dec;25(6):1318-26.
16. Lugo-Somolinos A, Sanchez JL. Prevalence of dermatophytosis in patients with diabetes. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Mar;26(3 Pt 2):408-10.
17. Muller, L. Increased risk of common infections in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug 1;41(3):281.

18. Vélez A, Linares M J, Fenández-Roldán J C, Casal M. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. *Mycopathologia*. 1997;137(1):1-8.
19. Wild, Sarah, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.



## ARTIGO 2



## 5.2 ARTIGO 2

### FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO G463A *MPO* EM DIABÉTICOS COM ONICOMICOSE

#### Resumo

**Objetivos:** Determinar a frequência do Polimorfismo G463A do Gene da mieloperoxidase em pacientes diabéticos tipo II com Onicomicose.

**Material e Métodos:** Este estudo foi realizado em 66 pacientes com diagnóstico de diabetes tipo II, que foram selecionados do Centro Médico Ermírio de Moraes, Recife-PE, onde foi realizada coleta de sangue periférico para genotipagem e raspado de lesões ungueais com diagnóstico clínico de onicomicose, com confirmação de 24 casos (diabetes associado a fungos).

**Resultados:** Das 66 amostras encontramos 24 com infecção fúngica, os genótipos encontrados foram 60% G/G, 24% G/A e 16% A/A. Os pacientes que apresentaram cultura positiva, não apresentaram diferença proporcional entre os grupos de genótipos analisados.

**Conclusão:** A frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G463A do gene *MPO* foi para G/G(36%), G/A(43%) e A/A(27%). Não foi detectada associação ao se relacionar à micose, diabetes e o polimorfismo (G463A).

**Palavras-chaves:** Polimorfismo genético, mieloperoxidase, onicomicoses e diabetes mellitus.

### Abstract

Diabetes mellitus type 2, is a disease with high prevalence and high mortality worldwide. The persistence of hyperglycemia in the disease course is observed with classic patterns of nephropathy, retinopathy and neuropathy. Such complications associated with increased susceptibility of diabetic patients are known to develop infections, which aggravate further the quality of life of these patients. Fungal infections, more frequently in diabetic patients, correspond to onychomycosis. In the study conducted at the Reference Center for Diabetes Ermírio de Moraes, in Recife. The frequency of occurrences during the period June to November 2013, demonstrated that all 66 patients with type 2 diabetes showed clinical signs for onychomycosis. Of these, 24 (36.3%) revealed confirmation for fungal etiology, especially *Candida krusei* (45.8%) as one of the most frequent species. Rates of glucose and glycated hemoglobin were elevated in 37.5% of patients with mycosis. The frequency of genotypes and alleles of the polymorphism G463A gene MPO G / G (36%), G / A (43%) A/A (27%). No association was found to be related to ringworm, diabetes and polymorphism (G463A).

**Keywords:** Onychomycosis, *Candida*, Diabetes Mellitus, Polymorphism, Myeloperoxidases.

**Introdução:**

De uma forma geral, considera-se o diabético um indivíduo com uma maior suscetibilidade às infecções, sejam elas bacterianas, fúngicas ou virais. Sabe-se também que algumas infecções são mais frequentes em pacientes diabéticos e outras exclusivas destes, e existem evidentes alterações imunitárias em pacientes com diabetes [1]. Várias alterações imunitárias vêm sendo descritas no diabetes, sendo a imunidade celular mais comprometida, com alterações nos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos. Nos polimorfonucleares há alterações na aderência, quimiotaxia, fagocitose, queima oxidativa e capacidade oxidativa intracelular, havendo estudos que demonstram relação inversa entre este último mecanismo imunitário e os níveis de hemoglobina glicada [3].

Não existem evidências de grandes alterações na resposta imunitária humoral no diabetes, ocorrendo níveis normais de imunoglobulinas e resposta imunitária humoral aos antígenos vacinais semelhantes à de indivíduos não diabéticos [2].

A destruição de microorganismo é desempenhada em grande parte por mecanismos dependentes de oxigênio (4). A geração de intermediários reativos de oxigênio ocorre devido à rápida ativação de uma oxidase (NAPH oxidase), que oxida o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P reduzido) e, nesse processo, reduz o oxigênio formando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é convertido espontaneamente em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) [5].

O  $H_2O_2$  gerado pelo sistema NADPH oxidase normalmente não é suficientemente eficaz para matar os microorganismos por se só. Entretanto, os grânulos azurofílicos dos neutrófilos contém a enzima mieloperoxidase (MPO), que na presença de um halógeno com o  $Cl^-$ , converte o  $H_2O_2$  em hipocloreto (HOCl), representando um potente agente microbiano que destrua os microorganismos pela halogenação ou pela oxidação de proteínas e lipídios (peroxidação lipídica) [5].

A deficiência primária da mieloperoxidase é o defeito mais comum dos neutrófilos e monócitos. A maioria dos pacientes não apresenta sintomatologia, visto que utilizam outros mecanismos de defesa (6). Esta deficiência está associada à herança autossômica recessiva. O defeito genético ocorre na fase de pré-tradução, com consequente redução na quantidade de mRNA para a mieloperoxidase [7].

Nesta imunodeficiência observa-se a preservação da função quimiotática das células, bem como uma maior produção do ânion superóxido. A ação microbicida in vitro pode estar

um pouco reduzida para *S. Aureus* e acentuadamente mais reduzida para *Candida albicans* [7].

Estudos vêm correlacionando alterações gênicas simples a diminuição da ação da mieloperoxidase. No genoma humano foi identificado mais de 1,4 milhão de sítios de nucleotídeos únicos (*single nucleotide polymorphisms, SNP*) [10].

Este SNPs ou polimorfismos de sítio são também chamados de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP), que de maneira sucinta se refere a variação do comprimento do fragmento entre indivíduos que resulta de polimorfismos na sequência de DNA. Os SNPs são as formas mais comuns de polimorfismos no genoma humano. Estudos populacionais encontraram associação entre SNPs específicos e doenças multifatoriais, como hipertensão, doenças cardíacas e diabetes [11].

O polimorfismo G463A do gene da mieloperoxidase foi implicado como fator de risco para infecção em pacientes imunodeprimidos [8], assim como, também pacientes com anemia falciforme apresentaram elevado risco para desenvolvimento de eventos infecciosos quando exibiram este polimorfismo [9].

As onicomicoses são micoses superficiais que acometem unhas, as quais se tornam sem brilho, quebradiças, espessadas e com dobras periungueais contendo material córneo amarelado [13]. São causadas por fungos dermatófitos, principalmente pelo *Trichophyton rubrum* [13]. Estas lesões são usualmente extensas quando ocorrem em indivíduos por drogas ou por doenças, em diabéticos e em portadores de endocrinopatias [14].

Associada às alterações vasculares clássicas e ao trauma no diabetes, as onicomicoses ganham uma maior importância, pois, podem desencadear um processo inflamatório crônico periungueal, precipitando um ambiente favorável à invasão bacteriana e favorecendo complicações sérias desde úlceras a amputações de extremidades [15].

O presente estudo foi realizado para determinar a frequência do polimorfismo G463A do gene da mieloperoxidase em pacientes diabéticos tipo II com onicomicose.

### **Métodos:**

Este estudo foi realizado em 66 pacientes com diagnóstico de diabetes tipo II, selecionados do Centro Médico Ermírio de Moraes, Recife-PE, onde foi realizada coleta de sangue periférico para genotipagem e raspado de lesões ungueais com diagnóstico clínico de onicomicose, com confirmação de 24 casos (diabetes associado a fungos).

A genotipagem foi realizada através da extração de DNA genômico a partir de leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmico modificado. Amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com posterior análise de restrição (RFLP). Como controle foram utilizados amostras de indivíduos homozigotos, heterozigotos e normal para indivíduos com polimorfismo G463A do gene *MPO*.

As identificações dos fungos foram obtidas através da escarificação de lesões clínicas, onde as amostras clínicas foram clarificadas com hidróxido de potássio a 20% (KOH) para hidrólise da queratina e detritos, facilitando a observação através de microscopia direta de elementos fúngicos. Para a cultura, as amostras foram inoculadas em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) com cloranfenicol (50 mg/L) contido em placas de Petri, incubadas a 30°C. O crescimento das culturas foi acompanhado durante 15 dias e as colônias puras transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud, mantidas a temperatura de 30°C por 15 dias e identificadas segundo critérios taxonômicos clássicos e moleculares (A,B).

#### **Análise Estatística:**

A frequência da distribuição dos genótipos do *MPO* foi calculada entre os pacientes com diabetes com e sem infecção fúngica, utilizando os testes de  $X^2$  de comparação de proporções, teste  $X^2$  de associação e teste exato de Fisher, para obter alguma conclusão estatisticamente significativa dos dados.

#### **Resultados:**

Microbiologia: Houve crescimento em meio de cultura Ágar Sabouraud e isolamento fúngico em 24 amostras das 66 examinadas.

**Tabela 1:** Resultado de cultura de fungos.

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
ISOLAMENTO DE FUNGOS	24	42	66

Micose x Polimorfismo: Os dados mostram um predomínio no grupo de genótipo G/G considerado normal, com 39 casos, correspondendo a 60% do total. O grupo heterozigoto de polimorfismo G/A apresentou 16 casos, correspondendo 24% do total. O grupo de homozigotos A/A apresentou 11 casos, que corresponde a 16% do total.

**Tabela 2:** Resultado da Genotipagem *MPO*

	G/G	G/A	A/A	TOTAL
Valor Absoluto	39	16	11	66
Proporção (%)	60%	24%	16%	100%

Os p-valores encontrados são todos maiores que o nível de significância escolhido para o teste (0,05). Constatamos, assim, que não houve evidência suficiente para rejeitar a Hipótese Nula (H0) a nenhum nível prático de significância para esses dados, nos 3 testes realizados. Desta forma, para esta amostra, não existe associação entre as variáveis genótipo e cultura, e as diferenças nas proporções entre os grupos G/G(36%), G/A(43%) e A/A(27%) com cultura positivas, não são estatisticamente significativas, para considerá-las como grupos estatisticamente distintos. Conclui-se que nesta amostra, a probabilidade de cultura positiva é a mesma nos diferentes genótipos.

## DISCUSSÃO

A atividade catalítica da MPO resulta na geração de vários oxidantes reativos. Embora estas espécies oxidativas tenham um papel importante na morte de microrganismos patógenos, elas também provocam danos tissulares no hospedeiro, através da modificação

oxidativa de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocasionando uma grande variedade de doenças inflamatórias crônicas [17].

Na literatura mundial, a imensa quantidade de trabalhos realizados acerca do polimorfismo G463A da MPO, refere-se a sua associação com doenças arteriais, sobretudo as doenças ligadas à aterosclerose, principalmente as patologias coronarianas. Observa-se também um interesse geral na investigação da participação desse polimorfismo no processo de iniciação das neoplasias. Makela e colaboradores encontraram associação com doença isquêmica coronariana, estando o genótipo G/G implicado com uma maior frequência entre os pacientes portadores de doenças das artérias. Ficou evidenciada que o alelo G tem uma maior participação na expressão da MPO diante da resposta inflamatória [18].

Houve uma concordância absoluta em todos os trabalhos que trataram deste tema, quanto à ao predomínio na distribuição da frequência do genótipo G/G frente aos G/A e A/A. Reynolds e colaboradores encontraram em um estudo com 142 pacientes com vasculite associada à ANCA (anticorpo anticitoplasma de neutrófilos) um painel de frequência de 76% G/G, 16%G/A e 8%A/A. Nesse mesmo estudo, concluíram haver forte evidência entre o genótipo G/G e o risco de desenvolvimento de vasculite associada à ANCA [15].

Katakami e colaboradores encontraram em estudo com pacientes japoneses portadores de diabetes tipo 2, um maior risco de desenvolvimento de macroalbuminúria e redução de filtração glomerular nos pacientes com alelo G ou com genótipo GG para o polimorfismo da MPO [19].

No presente estudo, como nos demais trabalhos publicados, encontramos o predomínio do genótipo G/G, com uma frequência de 59% em relação ao grupo total de 66 pacientes diabéticos tipo 2. Destes pacientes que apresentaram este genótipo, 36% (14 pacientes) exibiram confirmação positiva para infecção fúngica. A frequência dos genótipos dos 24 pacientes com cultura positiva foi de 58% G/G, 29% G/A e 13% AA. A análise comparativa entre esses três genótipos e cultura positiva encontrou p-valores superiores ao nível de significância (0,05) para todos os testes aplicados. Constatamos, assim, que não houve evidência suficiente para rejeitar a hipótese de não haver associação entre polimorfismo G463A do gene MPO e onicomicose a nenhum nível prático de significância para esses dados. Desta forma, para esta amostra, conclui-se que a probabilidade de cultura positiva é a mesma nos diferentes genótipos.

Na avaliação do SNP G-463A na região promotora do gene MPO em pacientes portadores de anemia falciforme, Costa sugeriu fortemente que em pacientes heterozigotos G/A, existe provável maior incidência de eventos infecciosos, bem como associação também se verificou na análise do alelo A. O genótipo AA ou AG aparentemente elevou o risco de eventos infecciosos, enquanto o genótipo GG pareceu estar associado a ausência de infecções. O fato da distribuição dos genótipos entre os pacientes falcêmicos e o grupo controle serem semelhantes indicou que a predisposição a infecções foi realmente devida a presença do alelo A [9].

O polimorfismo -463A diminui a expressão da MPO que por sua vez leva a redução da capacidade bactericida *in vitro* dos leucócitos. Apesar dos dados *in vitro* indicarem que a deficiência da MPO em neutrófilos parece não ser vital na função antimicrobiana, é possível que, *in vivo*, a atividade da MPO possa modular a resposta inflamatória diminuindo o dano celular provocado pelas bactérias. O sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halo é um potente sistema microbiana e sua falta ou diminuição de sua atividade em pacientes que já possuem uma debilidade na resposta imune pode ainda mais predispor-los a eventos infecciosos mais graves [9].

Desta forma, embora existam poucos relatos que correlacione o polimorfismo G463A da MPO com maior suscetibilidade à infecção, entendemos em razão da problemática que é a vasculopatia na predisposição às infecções cutâneas no diabetes, e, conjuntamente com a tendência que os estudos demonstram em comprovar a influência do polimorfismo G463A da MPO no risco aumentado de aterosclerose, o presente estudo necessita ser mais ampliado visando encontrar o papel desse polimorfismo não somente frente à suscetibilidade às infecções, bem como a participação da resposta inflamatória prolongada aos processos infecciosos de curso longo, tal como ocorre nas onicomicoses.

## REFERÊNCIAS

1. Nirmal J, Caputo G, Wietekamp M, et al: Primary care: Infections in patients with diabetes mellitus. N Engl J Med 1999;341:1906.
2. Albuquerque R, Neto AP. Diagnóstico, epidemiologia e fisiopatologia do diabetes. Diabetes na prática clínica e-book 2011[Acesso em 24 de março de 2012]. Disponível em:

<http://www.diabetesebook.org.br/modulo-2/15-a-sindrome-do-pe-diabetico-e-aspectos-praticos-e-fisiopatologia>.

3. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M *et al.* Impaired leucocyte function in diabetic patients. *Diabetic Med* 1997;14:29.
4. Nathan C, Shiloh UM. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*: 2000;97:8841.
5. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92:3007.
6. Pereira FEL. Imunopatologia. In: FILHO GB. *Bogliolo Patologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p.183-218.
7. Lima R. Imunodeficiências Primárias. [Acesso em 24 de março de 2013] Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABUu0AB/imunologia-18-imunodeficiencias-primarias>.
8. Rocha V, Franco RF, Porcher R, Bittencourt H, Silva WA Jr, Latouche A, Devergie A, Esperou H, Ribaud P, Socie G, Zago MA, Gluckman E. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3908-18.
9. Costa RNP. Polimorfismo dos genes Psgl-1, ICAM-1, CDI 8, mieloperoxidase e manifestações clínicas na anemia Falciforme. Campinas. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Médica-UNICAMP; 2004.
10. Carvalho MRS, Guimarães RCG. Bases Genéticas das Doenças. In: FILHO GB. *Bogliolo Patologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 319-356.
11. Clayton EW: Ethical, legal and social implications of genomic medicine. *N Engl J Med* 2003 Aug;349:562-65.
12. Filho, Geraldo Brasileiro. *Bogliolo Patologia*. 8. Ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, 2011.

13. Severo LC, Oliveira FM. Micoses. In: Focaccia, R ( Org.) *et al.* Veronesi: tratado de infectologia. 4. Ed. São Paulo: Atheneu; 2009. v.2. p. 1415-1461.
14. Albuquerque R, Neto AP. Complicações do diabetes e principais co-morbidades. Diabetes na prática clínica e-book 2011[Acesso em 24 de abril de 2013]. Disponível em: <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-2/15-a-sindrome-do-pe-diabetico-e-aspectos-praticos-e-fisiopatologia>.
15. Reynolds WF, Stegeman CA, Tervaert JWC. 463 G/A Myeloperoxidase Promoter Polymorphism Is Associated with Clinical Manifestations and Course of Disease in MPO-ANCA-Associated Vasculitis. *Clin Immunol.* 2002 May;103:154–160.
16. Costa, RN, Conran, N; Albuquerque, DM, Soares PH, Saad,ST, Costa FF. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematol* 2005 Jul;90:7 977-979.
17. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980 Sep;93(3):480-9.
18. Makela R, Dastidar P, Jokela H, Saarela M, Punnonen R, Lehtimaki T. Effect of long-term hormone replacement therapy on atherosclerosis progression in postmenopausal women relates to myeloperoxidase promoter polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug;88(8):3823-8.
19. Katakami N, Kume S, Kaneto H, Uzu T, Kashiwagi A, Yamasaki Y, Maegawa H, Shimomura L. Association of myeloperoxidase G-463A gene polymorphism with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic subjects. *Endocr J.* 2013 Apr; 60(4):457-71.
20. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. *J Gen Microbiol.* 1982 Jun;128(6):1265-77.
21. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras M J. *Atlas of Clinical Fungi.* 2.ed. Amer Society for Microbiology; 2000. 1126p.
22. Kumar AP, Piedrafita FJ et al. Peroxisome proliferator- activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. *J Biol Chem* 2004 Fev;279(9): 8300-15.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir:

- Os pacientes diabéticos avaliados desenvolveram apenas quadros clínicos de micoses superficiais.
- Onicomicose é a micose superficial prevalente em pacientes diabéticos, sendo estes acometidos principalmente nas lâminas ungueais dos pés.
- Indivíduos do sexo feminino são mais acometidos por diabetes *mellitus* e micoses superficiais, principalmente ao avançar da idade.
- Observamos que não houve associação entre polimorfismos G463A da MPO e susceptibilidade a micoses superficiais em indivíduos com diabetes *mellitus*.



## REFERÊNCIAS



## REFERÊNCIAS

ABBAS. A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. *Robbins & Cotran – Patologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2005. p. 49-90.

ABBAS, AK; KUMAR, V; FAUSTO, N. *Robbins & Contran – Patologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p 1243-1262.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. *Clinical Practice Recommendations*. Diabetes Care, v. 1, p.1-103, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. *Standards of Medical Care in Diabetes*. Diabetes Care, v.34, n. 1, p. 511-561, 2011.

AMPEL, N.M.; DIONNE, S.O.; GIBLIN, A.; PODANY, A.B.; GALGIANI, J. Mannose-binding lectin serum levels are low in persons with clinically active coccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 167, n. 4, p. 173-180, 2009.

ARAÚJO, J.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L.; SANTOS, S.; FALCÃO, E.A.; MILANESE, M.; SEGAT, L.; SOUZA, P.R.; LIMA-FILHO, J.L.; CROVELLA, S. Mannose binding lectin gene polymorphisms are associated type 1 diabetes in brazilian children and adolescents. *Human Immunology*, v.68, n. 9, p. 739-743, 2007.

ARSA, G.; LIMA, L.; ALMEIDA, S.S.; MOREIRA, S.R.; CAMPBELL, C.S.G.; SIMÕES, H.B. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. *Revista Brasileira Cineantropometria & Desempenho Humano*, v. 11, n. 1, p.103-111, 2009.

BARCELÒ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S. The cost of diabetes in Latin America and Caribbean. *Bull World Helth Organ*, v. 81, n.1, p. 19-27, 2003.

BOULTON, A.J.M. *et al.* American Diabetes Association. *Diabetic neuropathies: a position statement by the American Diabetes Association*. Diabetes Care 2005; 28:956-962.

BRISTOW, I. Non ulcerative skin pathologies of the diabetics foot, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, v. 24, Suppl. 1, p. 584-589, 2008.

CALSOLARI, M.R.; ROSÁRIO, P.W.S.; REIS, J.S.; SILVA, S.C.; PURISCH, S. *Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto ou Diabetes Melito Tipo 2 Magro* Arquivos Brasileiros de Diabetologia, v. 53, p. 2504-2508, 2010.

CARVALHO, M.R.S.; GUIMARÃES, R.C. *Bases Genéticas das Doenças*. In: FILHO, G.B. Bogliolo Patologia. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.319-356.

CESSE, E.A.P., CARVALHO, E.F., SOUZA, W.V., LUNA, C.F. Tendência da mortalidade por diabetes melito no Brasil: 1950 a 2000. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 6, p. 760-766, 2009.

CHACRA, A.R.; SILVA, R.C.; MIRANDA, W.L.; DIB, S.A. Insulin resistance , beta-cell function, and glucose tolerance in Brazilian adolescents with obesity or risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complicatios*, v.21, p.84-92, 2007.

COSTA, R.N.P. *Polimorfismo dos genes Psgl-1, ICAM-1, CDI 8, mieloperoxidase e manifestações clínicas na anemia Falciforme* / Raimundo Nonato Pereira da Costa. Campinas, SP:(s.n.), 2004

CRAIG, M.E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, v. 10, n. 12, p. 3-12, 2009.

DESHPANDE, A.D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, v. 88, n. 11, p. 1254-1264, 2008.

FILHO, A.B.L., SILVA, A.M.R., MOURA, P., SARINHO, E.S.C. Avaliação do complemento na doença meningocócica. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 34, n. 1, p. 3-6, 2011.

FORTI, A., LOUREIRO, R., GUSMÃO A., TEIXEIRA, L. *Diabetes mellitus - Classificação e Diagnóstico*. In: Vilar, L. Endocrinologia Clínica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006. Cap. 43, p. 539-550.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; BRITO, T.; BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C. *Patologia: processos gerais*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.135-152.

GÓES, A.P.P.; VIEIRA, M.R.R.; LIBERATORE, R.D.R. Diabetes mellitus tipo 1 no contexto familiar e social. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 25, p. 124-8, 2007.

HOVIND, P.; HANSEN, T.K.; THIEL, S.; STENFFENSEN, R.; FLYYBIERG, A.; PARVING, H.H. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes*, v.54, n.5, p.1523-7, 2005.

JOSHI, N.; CAPUTO, G.M.; WEITEKAMP.; KARCHEMER, A.W. Infectios in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, p. 1906-1912, 1999.

KAUNISTO, M.A.; SJOLIND, L.; SALLINEN, R.; PETTERSSON-FERMHOLM, K.; SARAHEIMO, M.; FROJDO, S.; FORSBLOM, C. *et al.* Elevated MBL concentrations are not an indication of association between the MBL2 gene and type 1 diabetes or diabetic nephropathy. *Diabetes*, v.58, n.7, p.1710-4, 2009.

KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.*, v.93, n.3, p. 480-9, 2002.

KUMAR, A.P.; PIEDRAFITA, F.J.; REYNOLDS, W.F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. *J Biol Chem*, v. 27, n.9, p.8300-15, 2004.

LEVINSON, W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.396-425.

LEWI, David Salomão. *Diabetes na prática clínica – Capítulo 10 - Infecções no paciente diabético*. 2012. Disponível em: < <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-2/20-infeccoes-no-paciente-diabetico>>. Acesso em: 07 de Fevereiro de 2013.

MAITRA, A.; ABBAS, A.K. *O sistema endócrino*. In: ABBAS. A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran – Patologia. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2005. p.1243-1262.

MARASCHIN, J.F.; MURUSSI, N.; WITTER, V.; SILVEIRO, S.P. Classificação do Diabete Melito. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 95, p. 40-47, 2010.

MINELLI, L.; NONINO, A.B.; SALMAZO, J.C.; NEME, L.; MARCONDES, M. Diabetes mellitus e afecções cutâneas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 6, p. 735-747, 2003.

MULLER, L.M.A.J.; GORTER, K.J.; HAK, E.; GOUDZWAARD, W.L.; SCHELLEVIS, F.G.; HOEPELMAN, A.I.M.; RUTTEN, G.E.H.M. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Increased Risk of Infections*, v. 41, p. 281-288, 2005.

OLIVEIRA, A.F.; VALENTE, J.G.; LEITE, I.C.; SCHRAMM, J.M.A.; AZEVEDO, A.S.R.; GADELHA, A.M.J. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 6, p. 1234-1244, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em 16 out 2012.

PAPELBAUM, M.; MOREIRA, R.O.; COUTINHO, W.; KUPFER, R.; ZAGURY, L.; FREITAS, S.; APPOLINARIO, J.C. Depression, glycemic control and type 2 diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 3, n. 26, p. 1-15, 2011.

PAVLOVIĆ, M.D.; MILENKOVIĆ, T.; DINIĆ, M.; MIŠOVIĆ, M.; DAKOVIĆ, D.; TODOROVIĆ, S.; ĐACOVIĆ, Z.; ZEČEVI, R.D.; DODER, R. The prevalence of cutaneous manifestations in young patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, v. 30, n. 8, p. 1964-1967, 2007.

PEREIRA, E.L.P. *Inflamações*. In: FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.183-218.

PIEDRAFITA, F.J.; MOLANDER, R.B.; VANSANT, G.; ORLOVA, E.A.; PFAHL, M.; REYNOLDS, W.F. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem.*, v.271, n.24, p.14412-20, 1996.

RAMOS, A. *Manifestações dermatológicas do diabetes, 2010*. Disponível em: <http://www.diabetesebook.br/novo/modulo-2/17-manifestacoes-dermatologicasdodiabetes>. Acesso em 21/04/2013.

REYNOLDS, WF; STEGEMAN, CA; TERVAERT, JWC. 463G/A Myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-Associated vasculitis. *Clinical Immunology*, v. 103, p.150-160, 2002.

ROCHA, J.L.L., BAGGIO, H.C.C., CUNHA, C.A., NICLEWICZ, E.A., LEITE, S.A.O., BAPTISTA, M.I.D.K. Aspectos relevantes da interface entre diabetes mellitus e infecção. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, n. 3, p. 221-229, 2002.

ROCHA, L.O.S. *Pâncreas endócrino*. In: FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.1161-1170.

RODACKI, M., ZAJDENVERG, L., MILECH, A., OLIVEIRA, J.E.P. Dosagem do peptídeo C sérico ao acaso em adultos com diagnóstico clínico de diabetes mellitus tipo 1. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, n. 3, p. 238-41, 2008.

RODRIGUES, T.C.; ALMEIDA, F.K.; RICARDO, E.D.; BIAVATTI, K.; GAMBOA, M.L. Infecções no paciente com, diabetes melito. *Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre*, v. 30, n. 4, p. 391-399, 2010.

RODRIGUEZ, E.C. Manifestaciones cutâneas de la diabetes mellitus. *Univ. Med.*, v. 44, Suppl. 4, p. 179-187, 2003.

SANTOS, E.B. *Imunologia nas Doenças Infecciosas*. In: FOCACCIA, R. Veronesi: tratado de infectologia. 4. ed. Rev. e atual. São Paulo, 2010, p. 9-24.

SCHMITT, M.L.; RIBEIRO, S.L.; PAES, M.A.S.; RIBEIRO, R.M. Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim-SC. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 41, n. 1, p. 43-45, 2009.

SNUSTAD, D.P; SIMONS, M.J. *Fundamentos de Genética*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.394-431).

SNUSTAD, D.P; SIMONS, M.J. *Fundamentos de Genética*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.354-393).

SNUSTAD, D.P.; SIMONS, M.J. *Fundamentos de Genética*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.772-795).

TAKEHARA, K.; OE, M.; TSUNEMI, Y.; NAGASE, T.; OHASHI, Y.; IIZAKA, S.; UEKI, K.; TSUKAMOTO, K.; KADOWAKI, T.; SANADA, H. Factors associated with presence and severity of toenail onychomycosis in patients with diabetes: A cross-sectional study. *International Journal of Nursing Studies*, v. 48, p. 1101-1108, 2011.

VELHO, G.; ROBERT, J.J. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): genetic and clinical characteristics. *Horm Res 57 Suppl*, v.1, p.29-33, 2002.

VELLOSO, L.A.; CARNEIRO, E.M.; CREPALDI, S.C.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. *Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets*. *FEBS Lett* 377:353-357, 1995.

WEBER, M.B.; SILVA, M.C.A. *Manifestações cutâneas em pacientes com diabetes melito*. *Arquivos médicos Canoas*, v. 8, Suppl.2, p. 31-45, 2005.

WILD, S; ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. *Global prevalence of diabetes*. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Publicado em: Health Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111519>>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2013.

YASUDA, MAS; MAGRI, M.M.; KONO, A.S.; SATO, P.K. *Imunologia das micoses*. In: FOCACCIA, R. Veronesi: tratado de infectologia. 4. Ed. Rev. e atual. São Paulo, 2010. p.1461-1479.

ZHANG, P., ZHANG, X., BROWN, J., VISTISEN, D., SICREE, R., SHAW, J., NICHOLS, G. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 87, p. 293-301, 2010.



# ANEXOS



## ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 62/2011 (CAAE: 0042.0.447.000-11) intitulado: **“SUSCEPTIBILIDADE ÀS MUCOSES NO DEBATES MELLITUS ASSOCIADA AO POLIMORFISMO G463A DO GENE DA MIELOPEROXIDASE”** apresentado pela pesquisadora responsável **João Carlos de Melo Araújo**, foi aprovado nesta data, pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - SPCC / Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca da SPCC / HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 10 de abril de 2012.

**Dr. Glauber Leitão**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer  
Hospital de Câncer de Pernambuco

## ANEXO II – Autorização do Hospital Ermírio de Moraes



Prefeitura do Recife  
Secretaria de Saúde  
Diretoria Geral de Gestão do Trabalho e Educação na Saúde  
Gerência de Formação e Educação na Saúde  
Gerência Operacional de Educação Permanente

CI nº. 546 / 2011 - GOEP/GFES/DGGTES/SS

Recife, 11 de outubro de 2011.

Prezado(a) Senhor(a),

Informamos que o pesquisador do programa de pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, **João Carlos de Melo Araújo, está autorizado** a desenvolver o projeto de pesquisa, nesse serviço, sob o título: **“Susceptibilidade às micoses no Diabetes Mellitus associada ao polimorfismo G463A do gene da Mieloperoxidase”**.

Solicitamos agendamento com o pesquisador para definição de cronograma de realização da pesquisa, considerando a disponibilidade do serviço.

Cordialmente,

**Cristiana Almeida**  
Gerente Operacional de Educação Permanente

Cristiana Almeida  
Gerente Oper. de Educação Permanente  
DGGT/SS Matr. 89.618-1

Ilmo (a). Sr (a).  
**Geórgia Albuquerque**  
Diretora do Distrito Sanitário III

## ANEXO III – Carta de anuência da Prefeitura do Recife – Secretaria de Saúde



Prefeitura do Recife  
Secretaria de Saúde

## CARTA DE ANUÊNCIA

Autorizo **João Carlos de Melo Araújo**, pesquisador do programa de pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, a desenvolver pesquisa no Centro Médico Senador José Ermírio de Moraes do Distrito Sanitário III, da Secretaria de Saúde do Recife, sob o título: "**Susceptibilidade às micoses no Diabetes Mellitus associada ao polimorfismo G463A do gene da Mieloperoxidase**", sob orientação de Rejane Pereira Neves.

Estarei ciente que me são resguardados e abaixo listados:

- O cumprimento das determinações éticas da resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde.
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa;
- A liberdade de recusar a participar ou retirar minha anuência, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma;
- A garantia de que nenhuma das pessoas envolvidas será identificada e terá assegurado privacidade quanto aos dados envolvidos na pesquisa;
- Não haverá nenhuma despesa para a Secretaria de Saúde do Recife decorrente da participação na pesquisa.
- O(s) pesquisador(es) comprometem-se a trazer para esta diretoria o relatório final da pesquisa através de cópia em *Compact Disk* (CD), uma vez que só serão autorizadas novas pesquisas se não houver pendências de devolutiva do serviço.

Tenho ciência do exposto e concordo em fornecer subsídios para a pesquisa.

Recife, 11 de outubro de 2011.

**Cinthia Kalyne de A. Alves**  
Diretora Geral de Gestão do Trabalho e Educação na Saúde

Cinthia Kalyne de A. Alves  
Diretora Geral de Gestão do Trabalho - DGGT  
Secretaria de Saúde  
Matr. 89.642-0

Centro Médico Senador  
José Ermírio de Moraes  
Em: 31/05/12  
*Belena*  
Fone: 33552621

## ANEXO IV – Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu.....RG.....

abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participação no projeto de pesquisa intitulado: Susceptibilidade às Micoses no Diabetes Mellitus Associada ao Polimorfismo G463A do gene da Mieloperoxidase.

A pesquisa é coordenada por João Carlos de Melo Araújo, a quem poderei contactar / consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone nº (82) 99769495 ou e-mail [jcpatologia@uol.com.br](mailto:jcpatologia@uol.com.br)

1. O objetivo da pesquisa é avaliar uma alteração no gene responsável pela produção da mieloperoxidase (enzima que participa na defesa do organismo), e identificar se pacientes com diabetes melitus têm alteração neste gene, estando ele mais propenso a apresentar infecção por fungos - através de um exame laboratorial chamado PCR (reação de polimerase em cadeia).
2. A coleta do material para estudo segue os seguintes passos: (a) Serão obtidos material subungueal (onde será raspado com espátula própria embaixo da unha); (b) Será colhido sangue dos pacientes (exame de PCR); (c) O resultado do exame será entregue ao médico responsável para que este lhe informe, assim como uma cópia do resultado também estará disponível ao participante do estudo e poderá ser requerida ao médico responsável; (d) Após análise de vários casos, esperamos ter informação sobre a frequência de pacientes diabéticos que apresentem infecção fúngica e que tenham um defeito no gene da mieloperoxidase, e assim contribuir com medidas para a melhor tratamento.
3. Afirmando que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa, assim como fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos deste estudo. As informações colhidas durante o estudo terão caráter confidencial e informações pessoais não serão divulgadas.
4. Estou livre para interromper o estudo e retirar o consentimento de minha participação a qualquer momento durante a pesquisa, se assim desejar, por qualquer motivo, estando ciente de que tal fato não irá alterar a qualidade nem meus direitos quanto ao atendimento e tratamento necessário;
5. Fui também esclarecido(a) de que o uso das informações por mim oferecidas estão submetidos as normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde (MS). Compreendo que minha identidade será mantida em sigilo e que os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas.

**6. Riscos e Benefícios**

Riscos: Ocorrência de desconforto durante a coleta sanguínea.

Benefícios: Possibilidade de identificação e confirmação da infecção por fungo nos pacientes diabéticos, assim como identificar a alteração genética do paciente, o que irá fortalecer a necessidade de novas pesquisas.

7. Estou ciente de que, caso eu tenha dúvidas ou me sinta prejudicado(a), poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer / Hospital de Câncer de Pernambuco, situado na Av. Cruz Cabugá, 1597 – Santo Amaro/Recife – (081) 32178197, para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa, o qual tomará as medidas cabíveis.

8. O pesquisador principal da pesquisa me ofertou uma cópia assinada deste *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

Participante: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do(a) pesquisador(a): \_\_\_\_\_

# Normatização Adotada

Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Ciências da Saúde  
 Programa de Pós Graduação do Centro de Ciências da Saúde  
 Av. Professor Moraes Rego s/n – Cidade Universitária – CEP: 50670-901 – Recife-PE

## I - REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA

O aluno do Programa da Pós-Graduação /CCS/UFPE deve:

- 1 Apresentar a dissertação em formato de artigos\*, dos quais pelo menos um artigo deve ser enviado para publicação em revista indexada no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que serão submetidos. A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão a ser submetido à publicação.
- 2 Apresentar a tese em formato de artigos, dos quais pelo menos dois artigos devem estar submetidos à publicação em revistas indexadas no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que são submetidos (apresentar comprovantes para a defesa de tese). A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão também submetido à publicação.

## II – NORMAS DA APRESENTAÇÃO<sup>1</sup>

Estrutura	Ordem dos Elementos
	1.1 Capa
	1.2 Lombada
	1.3 Folha de rosto
	1.4 Errata (opcional, se for o caso)
	1.5 Folha de aprovação
	1.6 Dedicatória(s)
1. Pré- textuais	1.7 Agradecimento(s)
Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho	1.8 Epígrafe (opcional)
	1.9 Resumo na língua vernácula
	1.10 Resumo em língua estrangeira
	1.11 Lista de ilustrações
	1.12 Lista de tabelas
	1.13 Lista de abreviaturas e siglas
	1.14 Lista de símbolos
	1.15 Sumário
	2.1 Apresentação
2. Textuais	2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão)
	2.3 Métodos
	2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais)
	2.5 Considerações finais
	3.1 Referências
3. Pós-textuais	3.2 Apêndice (s)
Elementos que complementam o trabalho	3.3 Anexo (s)

<sup>2</sup>Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005 (NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).