



**SUSCEPTIBILIDADE ÀS MICOSES SUPERFICIAIS NO DIABETES *MELLITUS*
ASSOCIADA AOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE *MBL2***

MICHELE CHIANCA MACARIO

**RECIFE
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**SUSCEPTIBILIDADE ÀS MICOSES SUPERFICIAIS NO DIABETES *MELLITUS*
ASSOCIADA AOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE *MBL2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia aplicada

Aluna: Michele Chianca Macario

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Crovella

Colaboradores: MSc Lúcia Cordeiro
MSc Vera dos Santos

RECIFE

2012

Macario, Michele Chianca

Susceptibilidade às micoses superficiais no diabetes *mellitus* associada aos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*/ Michele Chianca Macario– Recife: O Autor, 2012.

79 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientador: Sérgio Crovella

Colaboradores: Lúcia Cordeiro e Vera dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Lectinas 2. Diabetes *mellitus* 3. Micose I. Neves, Rejane Pereira II. Crovella, Sérgio III. Cordeiro, Lúcia IV. Santos, Vera dos V. Título.**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-095

MICHELE CHIANCA MACARIO

**SUSCEPTIBILIDADE ÀS MICOSES SUPERFICIAIS NO DIABETES *MELLITUS*
ASSOCIADA AOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE *MBL2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Data da defesa: 27 de Fevereiro de 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (1º membro)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (2º membro)
Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTE

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães (1º membro)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paula Sandrin Garcia (2º membro)
Universidade Federal de Pernambuco

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”

John Quincy Adams

Agradecimentos

A Deus, por jamais ter me desamparado.

À minha orientadora Rejane, pela oportunidade e confiança.

Ao meu co-orientador Sérgio Crovella, pelo apoio técnico-científico.

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Hospital Barão de Lucena, Hospital das Clínicas de Pernambuco e ao Instituto Brasileiro de Diabetes, por abrirem as portas e confiarem no nosso trabalho.

A Dr^a Lúcia Cordeiro e Dr^a Vera dos Santos, por permitirem que eu fizesse parte das suas rotinas.

Aos queridos pacientes, indispensáveis para a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos a vocês.

As pessoas maravilhosas que não pouparam esforços, apesar do dia a dia conturbado de cada um, e muito me ajudaram durante essa jornada. Meu agradecimento a Aline Mary, Heidi, Igor e Carol Sanuzi.

Ao professor Marcos André, por toda ajuda ao abrir as portas do seu laboratório ao nosso trabalho.

Aos amigos da minha turma de mestrado, vocês são especiais e foram importantes ao tornarem os dias mais gratificantes mesmo quando tudo parecia conspirar contra. Vocês estarão sempre em minhas melhores lembranças.

Aos professores Oliane e Armando, por tornarem divertido e gratificante cada minuto dentro do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Micologia Médica, especialmente Fabíola (Bila) pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Thiago, por toda paciência e ajuda. Você é parte do meu crescimento.

Especialmente aos meus pais, que sempre me apoiaram e confiaram em mim. Obrigada por cada palavra de incentivo, por toda vibração a cada conquista. Essa vitória também é de vocês!

RESUMO

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína plasmática que participa do sistema de defesa inato neutralizando microrganismos patogênicos. Polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2* estão associados a baixos níveis séricos da proteína funcional, com influência na susceptibilidade a uma variedade de processos infecciosos. Indivíduos com diabetes *mellitus* apresentam maior susceptibilidade às infecções, dentre elas as infecções fúngicas. Porém as causas para esta condição ainda não estão completamente esclarecidas. O propósito desse estudo foi correlacionar susceptibilidade às micoses superficiais no diabetes *mellitus* aos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*. Foram incluídos no estudo 131 pacientes diabéticos dos ambulatorios de três centros hospitalares localizados no estado de Pernambuco, Brasil. Amostras sanguíneas foram coletadas destes pacientes para detecção dos polimorfismos estruturais no gene *MBL2*, bem como amostras clínicas para diagnóstico micológico. Para comparação estatística, foi utilizado um grupo controle sadio pertencente a um banco de amostras. Dos pacientes avaliados, 31 apresentaram lesões clínicas de micose superficial com prevalência de onicomicose (93,5%), maior acometimento das unhas dos pés (65,5%), mulheres (64,5%) e idosos (80,6%). Entre os agentes etiológicos identificados, destacaram-se as espécies do gênero *Candida* (64%). Observou-se maior frequência genotípica de homozigotos O/O para o grupo com micose quando comparado ao controle ($p=0,046$). Não houve diferença significativa ao se comparar os outros grupos avaliados. Observamos que a presença de polimorfismos estruturais no éxon 1 do gene *MBL2* está associada à maior susceptibilidade de pacientes diabéticos a infecções fúngicas superficiais.

Palavras-chave: Lectina ligadora de manose. Gene *MBL2*. Diabetes *mellitus*. Micoses superficiais.

ABSTRACT

Mannose binding lectin (MBL) is a plasma protein that participates in the innate defense system by neutralizing pathogens. Polymorphisms in the exon 1 of the *MBL2* gene are associated with low serum levels of functional protein that influence susceptibility for a variety of infectious processes. Individuals with diabetes *mellitus* present a higher susceptibility to infections, among them infection fungal. But the reasons for this condition are still not completely understood. The purpose of this study was to correlate susceptibility to superficial mycoses in diabetes *mellitus* to polymorphisms in the exon 1 of the *MBL2* gene. The study included 131 diabetics patients from ambulatories of three hospitals located in the state of Pernambuco, Brazil. Blood samples were collected from these patients for structural polymorphisms detection in the *MBL2* gene, as well as clinical samples for mycological diagnosis. A healthy control group belonging to a bank samples was used for statistical comparison. From the patients evaluated 31 had clinical lesions of superficial mycosis with a prevalence of onychomycosis (93,5%), greater involvement of toenails (65,5%), women (64,5%) and elderly (80,6%). Among the identified etiologic agents, stood out the species of the genus *Candida* (64%). It was observed a higher frequency of homozygous genotype O/O for the group with mycosis when compared to the control group ($p=0,046$). There was no significant difference when comparing the other groups. We observed that the presence of structural polymorphisms in exon 1 of the *MBL2* gene is associated with increased susceptibility of diabetic patients develop superficial fungal infections.

Keywords: Mannose binding lectin. *MBL2* gene. Diabetes *mellitus*. Superficial mycoses.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Å	Ângström
AC	Anticorpo
ADA	Associação Americana de Diabetes
Asn	Asparagina
C	Citosina
C2	Componente do sistema complement
C3	Componente do sistema complement
C4	Componente do sistema complement
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DRC	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
G	Guanina
Glu	Glutamato ou Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HbA	Hemoglobina A
HbA1c	Hemoglobina glicada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDDM	Diabetes <i>mellitus</i> insulino-dependente
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LADA	Diabetes auto-imune latente do adulto
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
MAP ou sMAP	Pequena proteína associada à MBL
MASP	Serino protease associada à MBL
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MBL2	<i>Mannose Binding Lectin gene</i>

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

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Pág.
Figura 1. Estrutura da Lectina Ligadora de Manose.....	30
Figura 2. Estrutura do gene <i>MBL2</i> . O éxon 0 não é traduzido em proteína. O éxon 1 codifica a região rica em cisteína e parte da região de colágeno. O éxon 2 é responsável por codificar o restante da região de colágeno. O éxon 3 codifica a região de dobradiça e o éxon 4 codifica o DRC.....	33
Figura 3. Alelos variantes alteram a região colagenosa da proteína MBL. MBL não funcional.....	34
 Capítulo 4	
Figura 1. Distribuição das espécies fúngicas de acordo com sexo, idade, tipo de diabetes e localização da lesão nos pacientes diabéticos.....	48
 Capítulo 5	
Figura 1. Agentes etiológicos de micoses em pacientes com diabetes <i>mellitus</i> ..	58

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Pág.
Tabela 1. Critérios de diagnóstico do diabetes <i>mellitus</i> segundo a Associação Americana de Diabetes (2011).....	24
Capítulo 5	
Tabela 1. Caracterização clínica e epidemiológica dos grupos em estudo quanto a sexo, idade, tipo de diabetes e sítios acometidos.....	57
Tabela 2. Distribuição alélica para o gene <i>MBL2</i> nos grupos diabéticos com micose, diabéticos sem micose e controle.....	59
Tabela 3. Distribuição genotípica para o gene <i>MBL2</i> nos grupos diabéticos com micose, diabéticos sem micose e controle.....	60

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	15
2.1.1 Considerações gerais.....	15
2.1.2 Epidemiologia da diabetes.....	16
2.1.3 Classificação do diabetes <i>mellitus</i>	18
2.1.4 Diagnóstico e avaliação do controle da diabetes.....	23
2.1.5 Diabetes e infecções.....	26
2.2 PROTEÍNA MBL E GENE <i>MBL2</i>	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	38
3.1.1 Manipulação das amostras clínicas.....	38
3.1.2 Purificação das culturas.....	38
3.1.3 Identificação dos agentes etiológicos.....	39
3.1.4 Avaliação clínica e epidemiológica.....	39
3.1.5 Seleção do grupo para estudo do gene <i>MBL2</i>	39
3.1.6 Extração de DNA.....	39
3.1.7 Genotipagem do gene <i>MBL2</i> por PCR em tempo real utilizando <i>Melting Temperature Assay</i> (Ensaio de Temperatura de Anelamento).....	40
3.1.8 Análise estatística.....	40
4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE ONICOMICOSE EM PACIENTES BRASILEIROS COM DIABETES <i>MELLITUS</i>.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Materiais e Métodos.....	44
Resultados.....	45
Discussão.....	46
5 MICOSES SUPERFICIAIS ASSOCIADAS AOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1 DO GENE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM DIABETES <i>MELLITUS</i>.....	50

Resumo.....	51
Introdução.....	52
Materiais e Métodos.....	53
Resultados.....	55
Discussão.....	61
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	78
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.	79

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM), uma das doenças crônicas mais prevalentes na população mundial (BASTOS JR. et al., 2005), é caracterizado 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 4 formas clínicas: diabetes *mellitus* tipo 1, diabetes *mellitus* tipo 2, diabetes *mellitus* gestacional e diabetes secundária a outras patologias.

Indivíduos com o DM apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de infecções, entre estas infecção fúngica. Entretanto, ainda não estão completamente esclarecidas 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).

O sistema complemento, incluindo a lectina ligadora de manose (MBL), associado à ação das células fagocitárias, fazem parte da resposta imune inata inicial aos microrganismos, apresentando como principal objetivo impedir a instalação das infecções (FILHO et al., 2011). A MBL é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado (SEGAT et al., 2009), componente central da via das lectinas do sistema complemento (GARCIA-LAORDEN et al., 2008). Desempenha um papel importante devido ao efeito antimicrobiano, através de sua capacidade de reconhecer hidratos de carbono na superfície microbiana (BOUWMAN et al., 2006; GARCIA-LAORDEN et al., 2008).

A produção desta proteína é codificada pelo gene *MBL2* e polimorfismos das regiões estruturais desse gene estão associados com deficiência parcial ou total de MBL no soro (DENHOLM et al., 2010). Essa deficiência tem sido associada ao aumento da frequência e severidade das infecções bacterianas, virais e fúngicas em crianças e adultos (DEAN et al., 2005).

Estudos vêm sendo realizados buscando avaliar essa possível correlação entre polimorfismos no gene *MBL2*, com consequente baixos níveis séricos de MBL, e a suscetibilidade às infecções, entre elas a infecção fúngica (AMPEL et al., 2009; GIRALDO et al., 2007; LAMBOURNE et al., 2009). Também existem relatos que associam essa deficiência a afecções clínicas, entre estas o diabetes *mellitus* (ARAÚJO et al., 2007; MEGIA et al., 2004; TSUTSUMI et al., 2003).

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 susceptibilidade às micoses superficiais no diabetes *mellitus* aos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2* com conseqüente redução dos níveis séricos da MBL funcional.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES *MELLITUS*

2.1.1 Considerações gerais

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

Na doença, os sintomas característicos apresentados são sede (polidipsia), poliúria (excesso de urina), polifagia (fome excessiva), perda de peso, sonolência, dores generalizadas, câimbras e dormências, nervosismo, indisposição para o trabalho, desânimo, turvação da visão, cansaço físico e mental (GÓES; VIEIRA; LIBERATORE JR., 2007).

Em sua forma mais grave, o diabetes *mellitus* pode levar a cetoacidose diabética, a qual pode resultar em estupor, coma ou, na ausência de tratamento eficaz, em morte. Porém, muitas vezes os sintomas não são tão graves ou estão ausentes e, conseqüentemente, a hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas e funcionais pode estar presente por um longo período até que o diagnóstico seja realizado (OMS, 1999).

A hiperglicemia é um efeito comum da diabetes descompensada e a longo prazo, conduz a sérios danos a muitos dos sistemas do corpo, com provável disfunção e falência de vários órgãos, especialmente de nervos e vasos sanguíneos (OMS, 2011).

Essas conseqüências do DM a longo prazo acontecem devido a alterações micro e macrovasculares (BEM; KUNDE, 2006). Segundo Deshpande, Harris-Hayes e Schootman (2008), as complicações microvasculares incluem danos ao sistema nervoso (neuropatia), ao sistema renal (nefropatia) e lesões oculares (retinopatia). Complicações macrovasculares incluem a doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. Esta última pode levar a contusões ou lesões que não cicatrizam, gangrena e, por fim, à amputação.

Embora os tipos de complicações sejam semelhantes para DM tipo 1 e DM tipo 2, a frequência ou o tempo de ocorrência pode variar. Essas complicações podem apresentar-se em forma de episódios, que se repetem inúmeras vezes e podem ser tratadas; ou de maneira progressiva, que geralmente iniciam-se relativamente suaves, mas ao longo do tempo resultam em maiores danos aos órgãos e maior perda da funcionalidade, sendo essa forma, geralmente, irreversível (DESHPANDE; HARRIS-HAYES; SCHOOTMAN, 2008).

Sendo assim, a diabetes é uma doença crônica que exige o acompanhamento médico e uma contínua educação do paciente quanto a cuidados próprios para evitar complicações agudas e reduzir o risco em longo prazo (ADA, 2011).

2.1.2 Epidemiologia da diabetes

Segundo a Associação Americana de Diabetes - ADA (2007 *apud* PAPELBAUM et al., 2011, p. 3), os pacientes diabéticos devem manter baixos níveis de hemoglobina glicada, pressão arterial e lipoproteína de baixa densidade (LDL). No entanto, apenas 10% dos pacientes preenchem os três objetivos simultaneamente e, como consequência, o controle da doença é inadequado, levando a um aumento na morbidade e mortalidade (PAPELBAUM et al., 2011).

A prevalência mundial da doença tem apresentado um crescimento com proporções epidêmicas. Esse aumento deve-se a maior longevidade da população, associada ao consumo aumentado de gorduras saturadas e sedentarismo com consequente obesidade (FORTI et al., 2006).

O número estimado de diabéticos no mundo, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), no ano de 2003 foi de 194 milhões. Estimava-se que em 2025, a população de diabéticos alcançasse os 334 milhões (IDF, 2003), porém, segundo a OMS (2011), essa população atinge o número de 346 milhões de pessoas no mundo.

Em nível global, a prevalência de diabetes é semelhante em homens e mulheres, contudo apresenta-se ligeiramente maior em homens com idade inferior aos 60 anos e em mulheres em idades mais avançadas. Entretanto, o que se observa é um maior número de mulheres diabéticas se comparado aos homens. Acredita-se que devido a um maior número de mulheres idosas, na maioria das populações e ainda, um aumento da prevalência da diabetes com a idade seja a explicação mais provável para essa observação (WILD et al., 2004).

Nos países desenvolvidos, a maioria das pessoas diagnosticadas diabéticas apresenta-se com idade superior a 60 anos. Em contraste, nos países em desenvolvimento a maioria encontra-se na faixa etária entre 40-60 anos. Esta diferença provavelmente permanecerá até 2030, embora de forma menos acentuada, uma vez que a idade da população diagnosticada nos países em desenvolvimento irá aumentar um pouco mais do que nos países desenvolvidos (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

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 crescimento relativo da prevalência de diabetes *mellitus* será, entre 1995 e 2025, da ordem de 48% para os países em desenvolvimento e 27% para os países desenvolvidos (MORAES et al., 2010).

O Brasil, que no ano 2000 ocupava o oitavo lugar entre os dez países com maior número de casos de diabetes, apresentando 4,6 milhões de pessoas (WILD et al., 2004), ocupou em 2010 a quinta posição, totalizando 7,6 milhões de pessoas diagnosticadas (SHAW; SICREE; ZIMMET, 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 cerebrovasculares (CESSE et al., 2009).

Segundo Deshpande, Harris-Hayes e Schootman (2008), a 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 foram a óbito por conseqüências de elevada taxa glicêmica, e estima-se que esse número duplique entre os anos 2005-2030 (OMS, 2011).

De acordo com Zhang e colaboradores (2010), os diabéticos representam maior número de consultas ambulatoriais, maior uso de medicamentos, bem como uma maior probabilidade de hospitalização quando comparados a não diabéticos. 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; VIEIRA; LIBERATORE JR., 2007). Segundo Barceló e colaboradores (2003), medicamentos, hospitalizações e consultas representam, respectivamente, 43%, 10% e 24% dos custos diretos com diabetes *mellitus* na América Latina.

A diabetes é uma doença crônica que exige a manutenção do atendimento médico para redução do risco de complicações a 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).

2.1.3 Classificação do diabetes *mellitus*

A primeira classificação amplamente aceita de diabetes *mellitus* foi publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1980. O Comitê de Especialistas em 1980 propôs duas classes principais e as nomeou, diabetes *mellitus* insulino-dependente (IDDM) ou tipo 1, e diabetes *mellitus* não insulino-dependente (NIDDM) ou tipo 2. Também foram incluídos outros tipos de diabetes, tolerância a glicose, bem como diabetes *mellitus* gestacional - DMG (OMS, 1999).

Os termos diabetes *mellitus* insulino-dependente e diabetes *mellitus* não insulino-dependente são confusos e classificam o paciente quanto ao seu tratamento ao invés de serem classificados em função da patogênese (OMS, 1999). Em 1997, foi proposta pela ADA a classificação atual que é baseada na etiologia da doença, e não na sua forma de tratamento (FORTI et al., 2006). Dessa forma, os termos tipo 1 e tipo 2 tornam-se mais adequados, por indicarem a patogênese da doença e devem assim ser utilizados na classificação da diabetes (OMS, 1999).

Segundo a ADA (2011), a classificação da diabetes inclui 4 classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, DMG e outros tipos específicos de diabetes devido a diversas causas como, doenças do pâncreas exócrino como fibrose cística; uso de drogas após transplante de órgãos. Pode-se ainda citar a diabetes neonatal, quando é constatada hiperglicemia nos primeiros três meses de vida. É uma condição rara, que pode estar associada ao retardo do crescimento intra-uterino. Pacientes com diabetes neonatal transitória podem, mais tarde, apresentarem diabetes permanente (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

Pacientes com DM tipo 1 apresentam insulinopenia absoluta pronunciada com perda da função secretória das células β 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; HARRIS-HAYES; SCHOOTMAN, 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 insulinoterapia 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 serem em sua maioria crianças, adolescentes ou adultos jovens, o diagnóstico pode ser estabelecido em qualquer faixa etária (RODAKI et al., 2008). Esse tipo de diabetes é caracterizado pela destruição de células β pancreáticas, tornando-se clinicamente sintomática quando aproximadamente 90% das células β do pâncreas são destruídas (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

No DM tipo 1A, a destruição das células β é de etiologia auto-imune, 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 β ocorre devido à ação dos anticorpos, produzidos contra antígenos virais, que lesionam as células β , 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 β 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 auto-anticorpos contra as células β e progressão mais rápida a insulino-dependência (CALSOLARI 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 (SIMÕES; BANDEIRA, 2003).

Em geral, ocorre após os 30 anos em indivíduos 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 pelo menos cinco anos após o diagnóstico, diferenciando esse tipo do DM tipo 1, no qual há dependência da insulina (MARASCHIN et al., 2010).

Os principais mecanismos fisiopatológicos que levam à hiperglicemia no DM tipo 2 são, a resistência insulínica periférica nos adipócitos, principalmente no músculo esquelético; deficiente secreção de insulina pelo pâncreas e aumento na produção hepática de glicose, resultante da resistência insulínica no fígado (FORTI et al., 2006).

Devido uma significativa proporção de diabéticos tipo 2 apresentarem-se assintomáticos ou oligossintomáticos, o diagnóstico da doença é geralmente tardio. Este fato implica na presença, não raramente, de complicações micro e macrovasculares quando ocorre a detecção inicial da hiperglicemia (FORTI et al., 2006).

O tratamento atual do DM tipo 2 visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicamentos. Este último é indicado quando a dieta e a atividade física não são capazes de obter um bom controle, ou seja, glicemias de jejum, pós-prandial e hemoglobina glicada próximos aos níveis normais (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

O tratamento medicamentoso do DM tipo 2 é feito com hipoglicemiantes orais, entretanto, pelo menos 30% dos pacientes irão fazer uso da insulinoterapia para obtenção do controle glicêmico adequado. Isso ocorre devido a uma lenta e progressiva exaustão da capacidade secretória de insulina, uma característica intrínseca da célula β neste tipo de DM (FORTI et al., 2006).

Na categoria “outros tipos de DM”, destaca-se o *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY), uma forma de herança dominante de diabetes diagnosticada antes dos 25 anos (SHIELDS et al., 2010). O termo MODY é usado para descrever um grupo de formas clinicamente heterogêneas, sendo caracterizado por defeito na secreção de insulina, sem dependência da mesma (MARASCHIN et al., 2010).

A prevalência de MODY ainda não foi completamente definida, mas acredita-se que 2% a 5% dos pacientes diagnosticados como portadores de DM tipo 2 e cerca de 10% daqueles com aparente DM tipo 1 sejam, na verdade, MODYs (FORTI et al., 2006).

Ainda no quadro de “outros tipos de DM”, pode ser citada a diabetes originada pelo uso de glicocorticóides (reguladores do metabolismo de carboidratos), ciclosporina (droga imunossupressora que reduz as chances de rejeição de órgãos transplantados) e tacrolimus (droga imunossupressora), uma vez que essas drogas podem levar a um aumento da resistência à insulina e/ou diminuição da secreção insulínica por efeito tóxico direto sobre a célula β pancreática (BASTOS JR. et al., 2005).

O diabetes *mellitus* gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiramente identificada na gestação (BULZICO, 2011; 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 20ª e 24ª 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).

Normalmente, após o parto, o quadro se reverte, porém mulheres com passado de DMG são consideradas como tendo um maior risco de desenvolvimento de DM tipo 2 no futuro (BULZICO, 2011).

A classificação do diabetes *mellitus* geralmente é feita com base no quadro clínico do paciente. Porém em algumas situações, especialmente em adultos, a classificação correta do tipo de DM pode ser um pouco mais complicada, necessitando de investigação complementar, com detecção de auto-imunidade (dosagem de auto-anticorpos) e avaliação da capacidade secretória das células β pancreáticas (RODACKI et al., 2008).

Segundo Santos (2011), dentre os anticorpos (AC) que agem contra as células β , destruindo as ilhotas, os mais importantes são os anticorpos anti-insulina, o anticorpo anti-ilhota pancreática e o anticorpo contra enzimas das células β (anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico).

A autoimunidade contra as ilhotas pancreáticas foi descrita em 1965, mas a presença de AC contra as ilhotas foi demonstrada em 1974. Desde então diferentes tipos de anticorpos dirigidos ao pâncreas foram descritos, auxiliando no diagnóstico de pacientes com DM tipo 1, uma vez que a presença de anticorpos indica um DM de etiologia auto-imune, e portanto, do tipo 1 clássico, denominado tipo 1A (MARASCHIN et al., 2010). Quanto maior o número desses anticorpos, e quanto mais elevados forem seus títulos, maior a chance do indivíduo desenvolver a doença (FORTI et al., 2006).

Enquanto que a presença de anticorpos indica um DM tipo 1A, o DM tipo 1B é caracterizado pela ausência de tais anticorpos, não havendo uma causa aparente para a destruição das células pancreáticas (FORTI et al., 2006).

Os anticorpos são marcadores de autoimunidade e sua presença indica diabetes do tipo 1A. O AC anti-insulina está presente em indivíduos mais jovens, principalmente com início do DM antes dos 5 anos de idade, sendo o melhor marcador da doença nessa faixa etária. O antidescarboxilase do ácido glutâmico tem seu melhor desempenho nos indivíduos com início da doença acima dos 20 anos de idade, e é o que permanece por mais tempo. Os AC anti-ilhota estão presentes durante a fase de pré-diabetes e no início do quadro clínico, mas seus títulos diminuem rapidamente. A presença está associada à perda mais rápida da função da célula β e à previsão de necessidade de insulina em pacientes inicialmente classificados como DM tipo 2 (MARASCHIN et al., 2010).

A positividade dos anticorpos prediz a necessidade de insulina e sua solicitação está indicada nos casos de dúvida diagnóstica, que ocorrem especialmente quando a instalação do quadro de DM ocorre após os 30 anos de idade (MARASCHIN et al., 2010).

Além da utilização dos AC como auxiliar na classificação do tipo de DM, a avaliação da função secretória das células β também tem sido empregada. Uma das formas de avaliação seria a dosagem da própria insulina. Contudo, a dosagem da insulina plasmática tem utilidade limitada, uma vez que esta apresenta meia-vida curta (4 minutos), extração hepática variável e *clearance* intra e interindividual bastante variável. Portanto, a insulinemia plasmática, geralmente, não reflete de maneira fidedigna a capacidade secretória das células β pancreáticas. Além disso, os testes para medir insulina plasmática não distinguem insulina endógena da exógena, o que pode ser um importante problema no uso do teste em pacientes em insulinoterapia (RODACKI et al., 2008).

Uma alternativa para avaliação da função residual das células β , seria a dosagem do peptídeo C (PEPC). Segundo Rodacki e colaboradores (2008), a sua utilização apresenta algumas vantagens em relação à insulina. O PEPC é secretado, em quantidades equimolares, com a insulina, possui meia-vida mais longa (30 minutos), não sofre metabolização hepática significativa e possui *clearance* mais previsível.

A medida do PEPC pode ser realizada em condição basal, randômica (em qualquer horário do dia) ou estimulada por glucagon endovenoso (EV), intramuscular ou subcutâneo, por refeição mista ou por glicose oral ou EV (RODACKI et al., 2008). Porém, os dois estímulos mais utilizados são o glucagon EV e o teste da refeição mista, sendo este último recomendado pela ADA (MARASCHIN et al., 2010).

Como ponto de corte para classificar os pacientes, deve ser considerado que valores de PEPC basal acima de 0,9ng/mL e acima de 1,8ng/mL após a injeção de glucagon evidenciam reserva de insulina compatível com diabetes tipo 2 e valores inferiores confirmam o diagnóstico de diabetes tipo 1 (GROSS et al., 2002).

A concentração de PEPC fornece, assim, uma avaliação precisa da função residual das células β , tornando-se um importante marcador da secreção de insulina em pacientes com diabetes (LITTLE et al., 2008).

2.1.4 Diagnóstico e avaliação do controle da diabetes

O diagnóstico de diabetes *mellitus* passa por duas fases, a primeira na qual sugere doença (diagnóstico presuntivo ou hipotético), e a segunda, na qual se certifica da existência (diagnóstico de certeza). Para o correto diagnóstico se faz necessário não só interrogar e examinar o paciente, bem como conhecer seu histórico clínico e familiar (MORALES et al., 2006). Portanto, o diagnóstico da diabetes é realizado associando-se o aspecto clínico e laboratorial do paciente (FORTI et al., 2006).

Os sintomas clínicos clássicos do DM como a polidipsia, poliúria e polifagia, associados a perda de peso, são mais característicos do DM tipo 1, estando sempre presentes. Porém a obesidade não exclui o diagnóstico. Sintomas mais inespecíficos tais como tontura, dificuldade visual, astenia (fraqueza muscular) e/ou câimbras são mais comuns no DM tipo 2. Nesse tipo de diabetes cerca de 50% dos pacientes desconhecem ter a doença por serem assintomáticos ou oligossintomáticos e 80% apresentam-se acima do peso (FORTI et al., 2006).

Os critérios de diagnóstico para diabetes estão também baseados em medições de glicose no sangue. Três maneiras de diagnosticar essa doença são possíveis e cada uma delas, na ausência de hiperglicemia inequívoca, deve ser confirmada em um dia subsequente (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

Na ausência de sintomas, na presença de sintomas leves de diabetes, em condições infecciosas agudas ou por algum estresse, a hiperglicemia detectada pode ser transitória e não deve ser isoladamente considerada como diagnóstico de diabetes (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

Ao se detectar taxas de glicose elevadas em um paciente, é necessário certificar-se de que não estejam sendo causadas por outros fatores, tais como estresse, situações emocionais,

diuréticos, anti-hipertensivos, contraceptivos orais, antidepressivos, entre outros; uma vez que nem sempre a hiperglicemia é sinônimo de diabetes *mellitus* (MORALES et al., 2006).

O diagnóstico da diabetes não deve basear-se em uma única concentração de glicose no plasma, sendo necessária a observação contínua dos níveis glicêmicos em jejum, e/ou duas horas após refeição (glicemia pós-prandial) e/ou em um teste de tolerância oral à glicose (TOTG) (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009). Segunda a Associação Americana de Diabetes, existem alguns critérios que possibilitam o diagnóstico do diabetes *mellitus* como demonstrado na Tabela 1.

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

O nível glicêmico máximo considerado normal da glicemia de jejum é de 99mg/dL, estando a glicemia de jejum inapropriada (pré-diabetes) definida entre 100 e 125mg/dL (BEM; KUNDE, 2006). Pré-diabetes é uma condição precursora da diabetes na qual uma pessoa tem níveis elevados de glicose no sangue, porém não satisfaz os critérios diagnósticos de diabetes. Indivíduos com pré-diabetes podem ter glicemia de jejum alterada ou tolerância à glicose diminuída, ou ambos (DESHPANDE; HARRIS-HAYES; SCHOOTMAN, 2008).

A glicemia de jejum apresenta-se como a forma mais prática de se avaliar o nível glicêmico, e dois valores maiores ou iguais a 126mg/dL, obtidos em dias diferentes, são suficientes para se estabelecer o diagnóstico de diabetes *mellitus*. Valores glicêmicos entre 100 e 125mg/dL caracterizam a glicemia de jejum alterada e nesse caso, os pacientes devem ser submetidos ao TOTG (FORTI et al., 2006).

O TOTG consiste, após a coleta sangüínea para análise da glicemia de jejum, na administração de 75g de glicose anidra ou 82,5g de glicose monohidratada dissolvidos em 250 a 300 mL de água. Sendo administrado em crianças 1,75g/kg de peso corporal até um máximo de 75g (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009; FORTI et al, 2006).

No critério de diagnóstico considerado pela ADA, a dosagem da HbA1c é de extrema importância uma vez que a membrana da hemácia apresenta-se altamente permeável à molécula de glicose, fazendo com que a hemoglobina presente em seu interior fique exposta praticamente à mesma concentração da glicose plasmática (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

O termo hemoglobina glicada define um grupo de substâncias formado a partir da reação entre a hemoglobina A (HbA) e um açúcar. O componente mais importante deste grupo é a fração A1c, na qual um resíduo de glicose liga-se ao aminoácido valina, amino terminal, de uma ou de ambas as cadeias β da HbA. A ligação entre a HbA e a glicose é o produto de uma reação não-enzimática definida como glicação, ocorrendo em maior ou menor grau, conforme o nível de glicemia. A HbA1c permanece dentro das hemácias e sua concentração dependerá, basicamente, da taxa glicêmica média e da meia-vida das hemácias (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

A dosagem da HbA1c é considerada não só um critério diagnóstico como também um parâmetro essencial na avaliação do controle do DM. Visto que a quantidade de glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à concentração média de glicose no sangue, e como as hemácias possuem meia vida de aproximadamente 120 dias, a dosagem da glicose ligada à hemoglobina pode fornecer uma avaliação do controle glicêmico médio no período de 60 a 90 dias que antecedem a coleta de sangue para o exame (GOLDSTEIN et al., 2004, NETTO et al., 2009).

Uma vez que os níveis da HbA1c apresentem-se acima dos níveis de normalidade e uma medida terapêutica seja adotada, o intervalo para que essa hemoglobina retorne aos níveis estáveis é de aproximadamente dez semanas. Portanto, a repetição do exame de HbA1c para avaliar a eficácia do tratamento deve ser realizada somente dois a três meses após o início ou a modificação do esquema terapêutico. Caso deseje-se avaliar as mudanças glicêmicas em períodos mais curtos, deve-se utilizar outro método como critério de controle, a dosagem de frutossamina (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

A frutossamina é uma proteína glicada, formada pela reação não-enzimática entre glicose e proteína, sendo 60 a 70% dessa última a albumina sérica. A dosagem da frutossamina reflete, diretamente, a dinâmica da concentração de glicose das últimas 2 a 3 semanas (SALES et al., 2010), uma vez que a albumina apresenta uma meia-vida de até 20 dias (FORTI et al., 2006).

Entre tantos critérios diagnósticos, a glicemia de jejum ainda é o método de escolha por ser mais econômica, de fácil execução, favorecendo, dessa forma, a realização em maior número de pessoas. Esse método é, ainda, o mais recomendado pela ADA quando comparado

ao TOTG que na realização apresenta dificuldades devido à possibilidade de causar náuseas, necessitar de preparação prévia e apresentar maior variabilidade (GROSS et al., 2002).

De acordo com a ADA (2011), ao se realizar um teste diagnóstico de diabetes, assim como na maioria dos testes de diagnóstico, se faz necessário repetição para exclusão de possível erro laboratorial. É preferível que o mesmo teste seja repetido para confirmação diagnóstica, uma vez que haverá maior probabilidade de concordância neste caso. Por exemplo, se a HbA1c é de 7,0% e um resultado de repetição é de 6,8%, o diagnóstico de diabetes é confirmado. No entanto, se dois testes diferentes (como HbA1c e glicemia de jejum) estão ambos acima dos seus valores referenciais, o diagnóstico de diabetes também estará confirmado.

Entretanto, se dois diferentes testes são realizados e seus resultados apresentam-se discordantes, o teste cujo resultado encontra-se acima do valor referencial para o diagnóstico deve ser repetido, sendo o diagnóstico feito com base na confirmação deste (ADA, 2011).

O rastreamento da diabetes deve ser uma prática comum entre os indivíduos com mais de 45 anos de idade a cada 3 anos, ou mais precocemente e mais freqüentemente em indivíduos assintomáticos quando apresentarem fatores de risco para o desenvolvimento da doença (GROSS et al., 2002).

O diagnóstico correto e precoce do DM e das alterações da tolerância à glicose é extremamente importante já que permite adotar medidas terapêuticas que podem evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída, bem como retardar o aparecimento de complicações crônicas em pacientes diagnosticados com diabetes *mellitus* (GROSS et al., 2002).

2.1.5 Diabetes e infecções

Considerando-se a alta prevalência da diabetes, os médicos devem estar preparados não apenas para lidar com as intercorrências mais simples e cotidianas da doença, mas também com condições clínicas secundárias como infecções. 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, freqüentemente, apresentam algum tipo de lesão na pele que, geralmente, aparece logo após o desenvolvimento da doença, porém também podendo ocorrer como o primeiro sinal.

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 freqüentemente 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, tem sido sugerido 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 freqüentemente 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).

2.2 PROTEÍNA MBL E GENE *MBL2*

O sistema complemento (SC) é formado por aproximadamente 35 proteínas plasmáticas e associadas à membrana celular, constituindo uma das principais vias efetoras da resposta imunológica e inflamatória. Essas proteínas, ativadas em forma de cascata por meio de clivagens proteolíticas seqüenciais e formação de complexos de proteínas, desempenham importante papel na manutenção da homeostase do hospedeiro, uma vez que combatem microrganismos e removem complexos imunes circulantes bem como células apópticas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; TULAMO et al., 2010).

A cascata do SC é ativada por de três diferentes vias: clássica, alternativa e das lectinas (GULLA et al., 2009). Esta última consiste em moléculas padrão de reconhecimento denominada MBL (SCHLAPBACH et al., 2010).

A MBL é o componente central da ativação da via das lectinas do sistema complemento responsável por mediar um efeito antimicrobiano através da formação do complexo de ataque à membrana (GARCIA-LAORDEN et al., 2008) ou exercer papel de opsonina promovendo a fagocitose de microrganismos patogênicos por um mecanismo independente de anticorpo (SILVA, 2010). Embora o mecanismo desta última função não tenha sido completamente elucidado, presume-se que se houver atuação direta da MBL como opsonina, há uma interação com receptores específicos para colectinas expressos na superfície de células fagocíticas (CARVALHO, 2006).

Sua síntese é realizada no fígado e, embora essa proteína circule predominantemente no soro, também tem sido encontrada em outros sítios, como no fluido do ouvido médio, líquido amniótico de uma gestação de 26 semanas e secreção nasofaríngea (GARRED et al., 1993; MALHOTRA et al., 1994).

A MBL pertence à família de proteínas chamadas colectinas, cujos membros apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos associados a estruturas colagenosas (CARVALHO, 2006). A forma circulante de MBL consiste em múltiplos de cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa, possuindo cada cadeia quatro regiões distintas codificadas por éxons diferentes do gene *MBL2* (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; IP et al., 2009).

Cada cadeia tem uma região C-terminal, domínio de reconhecimento de carboidratos cálcio-dependente (DRC), através do qual a MBL se liga aos diferentes patógenos; um domínio hidrofóbico α -helicoidal (região de dobradiça); uma região que se assemelha ao colágeno contendo 19 trincas Gly-Xaa-Xaa e uma região N-terminal rica em cisteína (Figura 1). (ARAÚJO, 2009; CARVALHO, 2006; DOMMETT; KLEIN, TURNER, 2006).

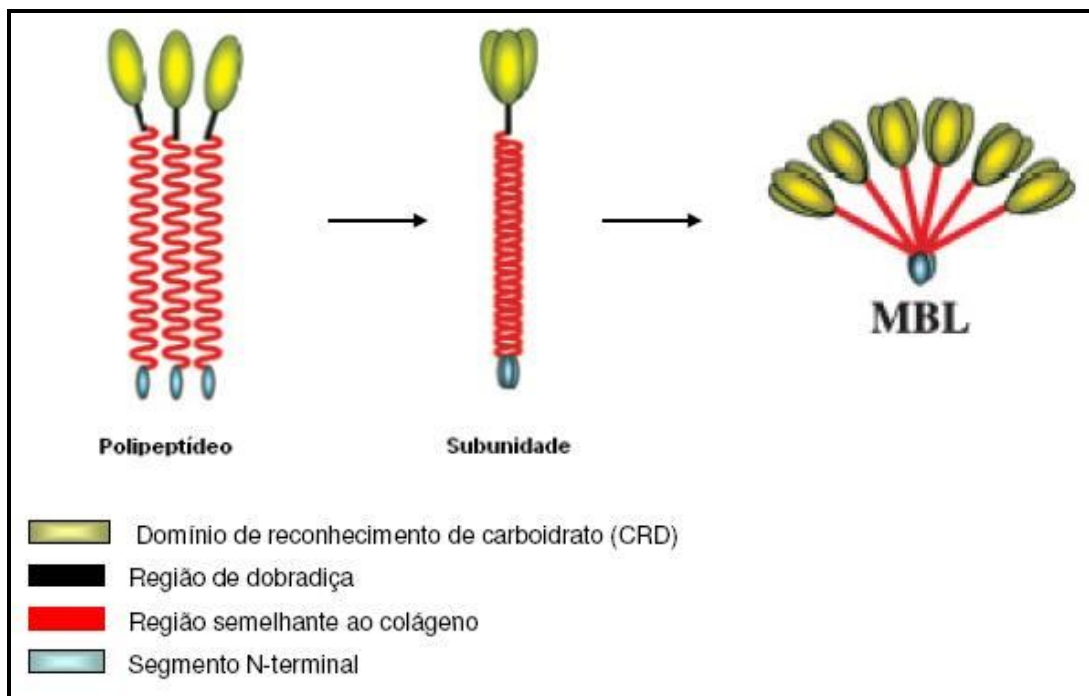


Figura 1. Estrutura da Lectina Ligadora de Manose.

DRC: Domínio de reconhecimento de carboidratos.

Fonte: KALIL, 2006.

Três cadeias polipeptídicas formam uma tripla hélice, interagindo através de suas regiões colagenosas. A região hidrofóbica de cada cadeia adota forma espiralada e os domínios de reconhecimento de carboidratos apresentam características de proteínas globulares (CARVALHO, 2006; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). O trímero é estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as regiões N-terminais, ricas em cisteína, de cada cadeia. Esta forma trimérica é a subunidade estrutural básica de todas as formas circulante de MBL (IP et al., 2009).

No soro, a MBL consiste de oligômeros, variando de dímeros a hexâmeros, que formam uma estrutura quaternária com a aparência de um “buquê de tulipas”, devido a uma interrupção na região colagenosa, dando origem a uma torção/dobradiça, segundo estudos de cristalografia de raios-x/eletromicrografias (CARVALHO, 2006; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

A MBL liga-se a açúcares como D-manose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina na superfície de vírus, bactérias e fungos, levando à ativação do complemento. Muitos destes açúcares não estão normalmente expostos em grandes quantidades nas superfícies celulares de mamíferos, o que dificulta o reconhecimento de estruturas próprias pela MBL e favorece uma

interação mais apropriada com superfícies celulares microbianas (CARVALHO, 2006). Além das estruturas de açúcar, tem sido demonstrado que a MBL também pode se ligar a fosfolipídios (KILPATRICK, 1998), ácidos nucleicos (PALANIYAR et al., 2004) e proteínas não-glicosiladas (IP et al., 2009).

Como todas as proteínas pertencentes à família das colectinas, a MBL mostra-se seletiva e dependente de cálcio ao realizar ligação com os açúcares D-manose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina, porém não apresenta seletividade para D-galactose e ácido siálico. Essa seletividade baseia-se na presença de resíduos de aminoácidos conservados dentro de seus domínios reconhecedores de carboidratos (DRCs) (IP et al., 2009).

O DRC contém uma região formada por três aminoácidos (Glu-Pro-Asn) que proporciona uma preferência por açúcares com grupos hidroxilas equatoriais 3-OH e 4-OH, como D-manose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina encontrados na superfície de vários microrganismos. A presença desse trímero de aminoácidos (Glu-Pro-Asn) é portanto essencial para a capacidade de distinção de próprio e não-próprio, uma vez que a maioria das estruturas de carboidratos animais é encerrada por ácido siálico e galactose, não reconhecidos pela MBL (IP et al., 2009).

O domínio α -helicoidal da região de dobradiça fornece flexibilidade para a orientação do DRC que reconhece a orientação específica dos grupos hidroxilas presentes em determinados açúcares, como D-manose e L-fucose. No entanto, a afinidade de um único DRC a um monossacarídeo é fraca e, portanto, uma forte interação requer ligações simultâneas de múltiplos DRCs (IP et al., 2009).

Estudos estruturais têm demonstrado que os três sítios de ligação de uma subunidade da proteína MBL (ou seja, a tripla hélice) são separados por uma distância constante de 45 Å (IP et al., 2009). Devido a essa distância, a ligação a uma molécula simples de manose se torna inviável, favorecendo tal interação com padrões repetitivos de açúcares. Embora a afinidade de cada interação lectina-açúcar seja de apenas 10^{-3} M, a oligomerização da MBL permite uma ávida ligação aos carboidratos, dada pela presença de múltiplos sítios que se ligam simultaneamente. Formas com menor grau de polimerização ligam-se menos avidamente aos açúcares, além de apresentarem falhas na ativação do complemento (CARVALHO, 2006).

Estudos recentes têm sugerido que MBL atua em processos inflamatórios, através do estímulo na liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6. Entre outras funções, a proteína ainda reconhece estruturas próprias alteradas e depura células apopticas (CARVALHO, 2006; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

Diferentemente de algumas proteínas de fase aguda, como por exemplo a proteína C-reativa, cujos níveis podem aumentar 10-1000 vezes durante a inflamação, os níveis de MBL são relativamente constantes, aumentando 2-3 vezes durante processos inflamatórios (IP et al., 2009).

Quanto à depuração das células apópticas, o atraso na remoção de tais células pode resultar na desintegração celular e liberação de componentes intracelulares, o que facilitaria a resposta auto-imune. Assim, tem sido sugerido que a deficiência de MBL pode levar ao acúmulo de restos celulares, o que predispõe os pacientes a auto-imunidade (CARRÉRA et al., 2010).

Entretanto, em estudo feito por Stuart e colaboradores (2005) em camundongos MBL nulo com atraso na remoção de células apópticas, foi possível observar que apesar da circulação prolongada dessas células não foi verificado qualquer sinal de doença auto-imune; sugerindo que a MBL exerça um papel na depuração de células apópticas, porém a propensão a desenvolver uma auto-imunidade exige mais do que uma falha no *clearance* dessas células (IP et al., 2009).

Para que a MBL exerça sua atividade funcional completa, é necessário que esteja no mínimo na forma de tetrâmero (CARVALHO, 2006; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006, IP et al., 2009). E uma vez que ocorra a ativação do sistema complemento pela via das lectinas, é necessário que a proteína MBL forme um complexo, através de sua região colagenosa, com diferentes proteases denominadas MASP-1, MASP-2, MASP-3 e a proteína de 19KDa sMAp ou MAp19 (CARVALHO, 2006).

MASP-1 e MASP-2 são codificadas por genes distintos, enquanto que a MASP-3 e sMAp são produtos de *splicing* alternativo de genes da MASP-1 e MASP-2, respectivamente. Apenas MASP-1 e MASP-2 possuem um domínio serina protease, o que sugere ser as outras MASPs apenas reguladoras da via. Estudos sugerem que a ligação da MBL à superfície celular inicia uma auto-ativação da MASP-2, ocorrendo clivagem do C4 e C2 para a formação da C3 convertase (C4bC2a); enquanto que a MASP-1 cliva, apenas, o C2 (IP et al., 2009; MATSUSHITA et al., 2000).

A proteína MBL é codificada pelo gene *MBL2*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossomo 10, sendo formado por quatro éxons (CHAGAS et al., 2005). O éxon 1 codifica o peptídeo sinalizador, a região rica em cisteína e parte da região de colágeno. O éxon 2 é responsável por codificar o restante da região de colágeno. O éxon 3 codifica a região de dobradiça e o éxon 4 codifica o DRC - Figura 2 (MONTICIELO, 2008).

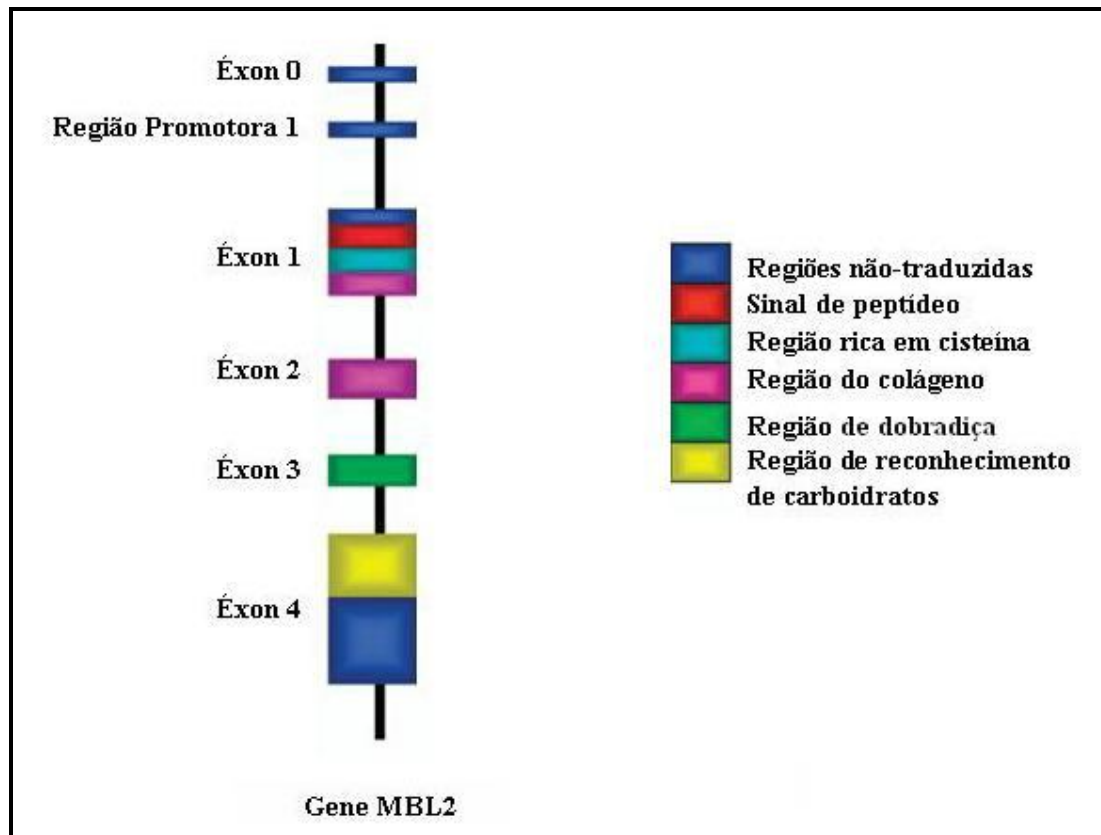


Figura 2. Estrutura do gene *MBL2*. O éxon 0 não é traduzido em proteína. O éxon 1 codifica a região rica em cisteína e parte da região do colágeno. O éxon 2 é responsável por codificar o restante da região de colágeno. O éxon 3 codifica a região de dobradiça e o éxon 4 codifica o DRC. Fonte: Adaptado de MARTINY, 2011.

Três polimorfismos comuns são encontrados no éxon 1, nos códons 52, 54 e 57, responsáveis por causarem substituições de aminoácidos, arginina-cisteína (CGT para TGT); glicina-ácido aspártico (GGC para GAC) e glicina-ácido glutâmico (GGA para GAA), respectivamente, na região de colágeno, alterando sua capacidade de oligomerização (Figura 3) (BOUWMAN; ROEP; ROOS, 2006; IP et al., 2009); apresentado os monômeros variantes resultantes baixa capacidade de fixação de complemento (EISEN; MINCHINTON, 2003).

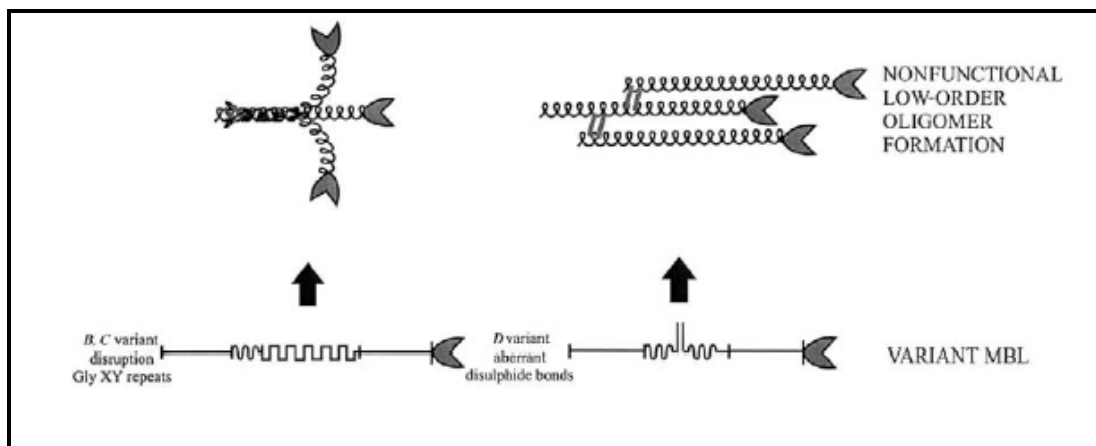


Figura 3. Alelos variantes alteram a região collagenosa da proteína MBL. MBL não funcional. Fonte: EISEN e MINCHINTON, 2003.

Por convenção, o tipo selvagem do gene é chamado de alelo 'A', estando associado a níveis normais de MBL. Os polimorfismos são chamados de 'B' (códon 54), 'C' (códon 57) ou 'D' (códon 52), refletindo a ordem de sua descoberta; sendo a presença de qualquer uma dessas mutações de codificação denominada de alelo 'O' (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Deficientes e baixos níveis séricos de MBL são principalmente devido à presença dessas três mutações, sendo esses níveis muito baixos ou ausentes encontrados em pacientes homozigotos para o alelo O (GARCIA-LAORDEN et al., 2008).

A concentração sérica da proteína MBL também pode ser alterada devido a polimorfismos presentes na região promotora do gene *MBL2*. Sequenciamento da região promotora 1 do gene *MBL2* revelou que esta é altamente polimórfica e três mutações, em particular, estão associadas com diferentes níveis da proteína independente dos alelos variantes estruturais do gene *MBL2*. Os três polimorfismos estão situados nas posições -550 (variante H/L resultante da substituição de G por C), -221 (variante X/Y, substituição de C por G) e na porção 5' não traduzida do éxon 1 na posição 4+ (variante P/Q, substituição de C por T). Apresentando o locus -221, que abriga a variante X, maior influência na redução dos níveis séricos de MBL (GARRED et al., 2009).

Essa proteína é considerada ainda um enigma da imunidade inata, devido ao seu caráter duplo, sendo relatada por alguns autores como uma “faca-de-dois-gumes”, citada como “Jekyll-and-Hyde” (SILVA, 2010). As implicações de baixos níveis de MBL têm sido alvo de um grande número de pesquisas devido a influência na susceptibilidade do hospedeiro

a uma variedade de recorrentes processos infecciosos e doenças auto-imunes (MILLER et al., 2010).

Porém, esses mesmos níveis baixos de MBL foram citados representando uma proteção contra microrganismos intracelulares como, por exemplo, *Leishmania* (SANTOS et al., 2001), uma vez que este se utiliza da opsonização e fagocitose mediada pela MBL para entrar na célula do hospedeiro, podendo assim se disseminar (CARVALHO, 2006; SILVA, 2010).

O primeiro caso de associação entre doenças e deficiência de MBL data de 1968. Neste estudo, de Miller e colaboradores (1968), uma menina sofria de infecções bacterianas recorrentes não responsivas à antibioticoterapia e esteróides, devido a uma deficiência de um fator do plasma que, embora desconhecido na época, era a proteína MBL (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Desde então, deficiência de MBL vem sendo associada ao aumento da frequência e severidade das infecções bacterianas, virais e fúngicas em crianças e adultos (DEAN et al., 2005).

Roy e colaboradores (2002) realizaram estudo em pacientes diagnosticados com doença pneumocócica invasiva, o qual demonstrou uma associação entre o genótipo *MBL* e o risco de desenvolver a doença. Os autores observaram que o genótipo homozigoto (OO) apresentava-se mais freqüente em pacientes portadores da doença quando comparados aos indivíduos controles. Da mesma forma, Eisen e colaboradores (2008) realizaram um estudo em portadores da infecção pneumocócica, demonstrando que a deficiência de MBL contribui para o aumento do risco de morte em pacientes com esta infecção.

Tan e colaboradores (2009) observaram em estrudos realizados na China, que a frequência de genótipos mutantes foi significativamente maior em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) quando comparados aos controles, bem como se apresentava associada à progressão da doença. Da mesma forma, em um estudo realizado por Silva (2010), os polimorfismos no gene *MBL2* foram encontrados em maior frequência em pacientes HIV positivos, de Porto Alegre, Brasil, quando comparados ao grupo controle, indicando que esses pacientes podem apresentar uma maior dificuldade na eliminação do patógeno, aumentando assim a suscetibilidade à infecção pelo HIV.

Ainda relacionando os polimorfismos no gene *MBL2* a infecções virais, Segat e colaboradores (2007) realizaram estudo com portadores da hepatite C do Nordeste brasileiro e observaram maior frequência do alelo variante O nesses pacientes quando comparados a um

grupo controle, indicando que a MBL pode ter um importante papel protetor na infecção pelo vírus da hepatite C.

Além dos estudos realizados buscando associar deficiência de MBL a infecções bacterianas e virais, várias são as pesquisas realizadas que buscam correlacionar essa mesma deficiência a infecções fúngicas. Giraldo e colaboradores (2007) realizaram um estudo no Rio Grande do Norte, Brasil, buscando associar polimorfismo no códon 54 no éxon 1 do gene *MBL2* e diagnóstico de candidíase vulvovaginal recorrente. Os autores observaram que mulheres com esta infecção apresentavam a frequência do alelo mutante 2 ½ maior quando comparadas ao grupo controle.

Em 2009, Ampel e colaboradores realizaram estudo no Arizona avaliando os níveis de MBL em pacientes com coccidioidomicose ativa. Puderam concluir que os pacientes, com qualquer forma sintomática da doença, apresentavam baixos níveis da proteína, sugerindo uma associação entre os níveis deficientes da MBL e a coccidioidomicose sintomática.

Os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*, com conseqüente diminuição da MBL funcional, também vem sendo associado a doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico (MONTICIELO, 2008; SANDRIN-GARCIA et al., 2011), artrite reumatóide (IP et al., 2000), doença celíaca (BONIOTTO et al., 2002), entre outras; uma vez que essa proteína se liga a células apopticas e restos celulares, contribuindo, assim, para eliminação de potenciais auto-antígenos (TSUTSUMI et al., 2003).

Existem também relatos associando deficiente MBL a algumas afecções clínicas como leucemias (SCHMIEGELOW et al., 2002), abortos recorrentes (CHRISTIANSEN et al., 1999), diabetes *mellitus* tipo 1 (TSUTSUMI et al., 2003), diabetes *mellitus* gestacional (MEGIA et al., 2004), entre outras.

Vários são os estudos que buscam compreender a razão para a maior susceptibilidade de pacientes diabéticos em desenvolver as mais diversas infecções e complicações clínicas (HANSEN et al., 2004; HOVIND et al., 2005; KAUNISTO et al., 2009). Porém, ao contrário do que se pensa, não são fortes as evidências clínicas que sustentam a associação entre DM e infecção. O que está bem definido é uma maior incidência de infecções específicas, muitas vezes com maiores taxas de complicações e maior severidade (ROCHA et al., 2002).

Dessa forma, faz-se necessário a realização de estudos para que se possa concluir a razão da maior susceptibilidade desses pacientes no desenvolvimento das mais diversas infecções, entre estas a infecção fúngica.

Os achados científicos correlacionando baixos níveis de MBL e doenças vêm se mostrando de grande importância, uma vez que a partir da identificação dessa deficiência, a

MBL pode ser administrada em quantidades terapêuticas objetivando a reconstituição de defeitos opsônicos e na recuperação de infecções (GUPTA; GUPTA; HAJELA, 2008), como demonstrado em alguns estudos realizados (GARRED et al., 2002; JENSENIUS et al., 2003; VALDIMARSSON, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram realizadas coletas, para diagnóstico micológico, de 131 pacientes com diabetes *mellitus* do Hospital Barão de Lucena (HBL), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e do Instituto Brasileiro de Diabetes (IBRADI), localizados em Recife, Pernambuco, no período de outubro/2010 a setembro/2011, de acordo com a solicitação médica.

Escamas ungueais e epidérmicas foram obtidas por escarificação da região, com auxílio de um bisturi e placa de Petri, previamente esterilizados. E, quando necessário, foi realizada a técnica de Porto (1953) com auxílio de fita adesiva e lâmina.

Após coleta, as amostras clínicas foram transportadas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco para realização do diagnóstico micológico.

O projeto passou pela aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE protocolado com o nº 307/10 e registrado no SISNEP FR – 366987(Anexo A). Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

3.1.1 Manipulação das amostras clínicas

Após a obtenção das amostras, foram preparadas lâminas para realização do exame direto clarificadas com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio (KOH), bem como as amostras coletadas através da técnica de Porto foram coradas com azul de metileno. Concomitantemente, foram semeadas, em duplicata, na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50mg/L) e de uma fonte de lipídios (1%), mantidas às temperaturas de 30°C e 37°C por um período de até 20 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e em seguida, identificadas.

3.1.2 Purificação das culturas

Fragmentos da colônia foram adicionados a água destilada esterilizada contendo 50mg/L de cloranfenicol. Desta suspensão, 0,2 mL foram semeados na superfície do meio Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50mg/L) contido em placas de Petri. As

unidades formadoras de colônia foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio específico, de acordo com o fungo isolado, para posterior identificação.

3.1.3 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), fisiológicas (assimilação e fermentação de fontes de carbono e nitrogênio) e bioquímicas (produção de urease e ácido acético) (BARNETT; PAINE; YARROW, 2000; DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

3.1.4 Avaliação clínica e epidemiológica

Foram avaliados os seguintes parâmetros: sexo, idade, tipos de diabetes, sítios anatômicos acometidos e agentes etiológicos identificados.

3.1.5 Seleção do grupo para estudo do gene *MBL2*

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção venosa, em tubos a vácuo do tipo Vacuette® contendo anticoagulante EDTA, de pacientes diabéticos com infecção micótica atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia do HC-UFPE, do HBL e IBRADI. Para controle do gene *MBL2*, foram utilizados pacientes portadores de diabetes atendidos nos mesmos serviços de saúde, sem micose, pareados em sexo e idade em relação aos pacientes, escolhidos aleatoriamente na população. Como controle sadio foi utilizado o banco de DNA do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

3.1.6 Extração do DNA

O DNA foi extraído do sangue periférico total utilizando o kit de extração AccuPrep® Genomic DNA, de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.7 Genotipagem do gene *MBL2* por PCR em tempo real utilizando o *Melting Temperature Assay* (Ensaio de Temperatura de Anelamento)

O DNA dos pacientes e controles foram genotipados para os SNPs (polimorfismos de único nucleotídeo) selecionados para o éxon 1 do gene *MBL2*, tomando como base a PCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real alelo específica, utilizando o “primer forward” (5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3') e “primer reverse” (5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3') com subsequente genotipagem por meio da curva de *Melting Temperature Assay*.

As reações de amplificações foram realizadas, de acordo com Arraes e colaboradores (2006), em um volume final de 25 µL com Master Mix 1X SYBR Green I (Eroclone, Milan, Italy), 150 picomoles do iniciador *forward*, 50 picomoles do iniciador *reverse* e 10 ng de DNA genômico. As condições de ciclagem foram os seguintes: 95°C por 10 minutos, seguida por 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 min, repetido 45 vezes no aparelho Rotor Gene-3000TM (Cobertt Research Mortlake, Sydney, Australia). Ao final da PCR, realizou-se protocolo de curva de *Melting*, o qual incluiu aquecimento lento de 60° a 95°C em etapas de 0,2°C com intervalo de 8 segundos entre as etapas. O perfil da curva de fusão foi obtido usando software de dissociação do aparelho *Corbett Rotor Gene*TM RG3000 (Uniscience Cobertt Research). De acordo com a temperatura de fusão foram analisados os genótipos do *MBL2*: AA (um pico de $83.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$), AO (dois picos de 82.6 ± 0.3 e $80.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) e OO (um pico de $81.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

3.1.8 Análise estatística

Para correlacionar as frequências gênicas com o aumento da susceptibilidade às infecções fúngicas foi utilizado o Teste do Qui-quadrado com a correção do Teste Exato de Fisher. O intervalo de confiança (IC) utilizado foi de 95%, portanto valores de “p” menores ou iguais a 0,05 foram aceitos.

4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE ONICOMICOSE EM PACIENTES BRASILEIROS COM DIABETES *MELLITUS*¹

¹Trabalho submetido para publicação na *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* como Chianca, M.M., Cordeiro, L.H.O., Santos, V.M., Lima, D.M.M., Crovella, S., Neves, R.P.

Resumo

A onicomicose é uma infecção fúngica que apresenta impacto deletério na qualidade de vida de indivíduos com diabetes *mellitus*. Geralmente essa infecção apresenta um curso mais grave nos diabéticos quando comparados a pessoas sem a diabetes. O objetivo do estudo foi identificar os patógenos fúngicos predominantes de onicomicoses em pacientes com diabetes *mellitus* de Recife, Pernambuco. Foram avaliados 131 pacientes com diabetes *mellitus* quanto à presença de lesões fúngicas. Amostras clínicas foram coletadas para realização do exame direto, clarificadas com KOH a 20% e, concomitantemente, inoculadas na superfície de Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50mg/L). As colônias foram identificadas segundo as características morfofisiológicas e bioquímicas. Dos pacientes avaliados, em 31 foi confirmada a suspeita clínica de infecção fúngica através do exame direto e/ou obtenção do agente etiológico. Desses pacientes, 29 apresentavam acometimento das lâminas ungueais (93,5%), sendo a diabetes tipo 2 predominante (86%). Apresentaram-se mais prevalentes mulheres (18 casos) e a faixa etária superior aos 60 anos (79%). As unhas dos pés foram mais acometidas, com 19 casos, e a apresentação clínica subungueal distal apresentou-se mais freqüente (86%). Foram identificadas leveduras do gênero *Candida* e *Trichosporon* e o fungo não dermatófito *Fusarium solani*, sendo mais prevalentes as espécies de *Candida* (69,5%). Onicomicose ocorre com alta prevalência em pacientes diabéticos, especialmente em idosos. A detecção prévia desta infecção contribui para a instituição de terapêutica correta e eficaz, diminuindo o risco desses pacientes apresentarem uma infecção disseminada.

Palavras-chave: Onicomicose. Diabetes *mellitus*. *Candida*.

Introdução

Onicomicose é definida como infecção fúngica da unha e representa um dos principais problemas dermatológicos de todas as onicopatias devido à alta taxa de falha terapêutica, dificuldades de gestão e tratamento (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2010). A incidência está relacionada a vários fatores, incluindo doenças como o diabetes *mellitus* (GODOY-MARTINEZ et al., 2009).

Pacientes diabéticos podem apresentar complicações em todo o corpo e as alterações das unhas por fungos representam um fator de risco para a gravidade do pé diabético devido a possíveis seqüelas como a amputação de membros inferiores (DROZDOWSKA; DRZEWSKI, 2008). Cathcart, Cantrell e Elewski (2009) afirmam que o tratamento imediato de onicomicose é um aspecto adicional de cuidados com os pés diabéticos que pode, potencialmente, diminuir o risco de amputação.

As infecções fúngicas podem também disseminar microrganismos para áreas adjacentes da pele, além de poder levar a uma deterioração adicional da qualidade de vida com diversas implicações para a saúde geral (NATHER et al., 2008; CATHCART; CANTRELL; ELEWSKI, 2009; KAFAIE; NOORBALA, 2010).

A identificação de fatores de risco pode ser a base para medidas preventivas que busquem reduzir tanto a infecção quanto recorrência, incluindo recaídas em pacientes susceptíveis como aqueles com diabetes *mellitus* (FAERGEMANN et al., 2005).

A infecção fúngica das unhas pode ser causada por três classes de fungos, dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não-dermatófitos (WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; CAMBUIM et al., 2011). Diferentes apresentações de lesões das unhas são observadas na prática clínica e estratégias de tratamento são fortemente influenciadas por essas características, bem como pela análise de laboratório microbiológico (PROMPERS et al., 2007).

Suspeitar de onicomicose, bem como realizar o diagnóstico micológico é importante para prevenir distrofia ungueal e disseminação da infecção (VEER; PATWARDHAN; DAMLE, 2007). Além disso, um bom controle da glicose no sangue pode prevenir as mudanças clínicas provocadas nas unhas (TAKEHARA et al., 2011).

Entretanto poucos estudos avaliaram a prevalência de onicomicoses entre os pacientes diabéticos (MAYSER; FREUND; BUDIHARDJA, 2009; GONZÁLEZ-AVILA et al., 2011). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi identificar os patógenos fúngicos predominantes de onicomicoses em pacientes com diabetes *mellitus*.

Materiais e Métodos

Foram incluídos no estudo 131 pacientes com diabetes *mellitus* (DM) atendidos no setor de Endocrinologia Clínica, para checkup de rotina, do Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Pernambuco-HC/UFPE), Hospital Barão de Lucena (HBL) e do Instituto Brasileiro de Diabetes (IBRADI), Recife, Brasil.

O estudo foi desenvolvido no período entre Novembro de 2010 e Novembro de 2011. Os pacientes foram incluídos no estudo somente após aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde com registro nº 307/10 e SISNEP FR – 366987, 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 inicialmente limpas com álcool a 70% e, posteriormente, coletadas 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 monitorado 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 Barnett, Paine e Yarrow (2000) e De Hoog e colaboradores (2000).

Foram realizadas preparações, com lactofenol azul de algodão, a partir das culturas para avaliação, sob o microscópio, de detalhes micológicos (LACAZ et al., 2002). O critério utilizado para considerar o fungo como patógeno, foi o isolamento do mesmo, em cultura, por duas ocasiões consecutivas, com intervalos de 10 dias. Quando estruturas fúngicas foram observadas em lâminas de microscopia direta e não houve crescimento de colônias fúngicas em culturas, a investigação micológica foi repetida, em pelo menos, duas outras ocasiões.

Assim, foi considerado que um paciente possuía onicomicose quando os achados clínicos e micológicos eram confirmados.

Resultados

Dos 131 pacientes diabéticos avaliados, em 31 foi confirmado envolvimento fúngico nas lesões clínicas através da observação de estruturas fúngicas ao exame direto e/ou obtenção do agente etiológico. Destes, 29 apresentaram envolvimento das lâminas ungueais (93,5%). Entre esses pacientes 86% possuíam diabetes *mellitus* tipo 2, 18 eram mulheres e 11 homens. A faixa etária variou dos 30 aos 83 anos, havendo prevalência de pacientes com idade superior aos 60 anos (79%).

Entre os 29 pacientes, 16 apresentaram lesões nas unhas dos pés, 10 das mãos e em três pacientes foram verificados o acometimento tanto das unhas dos pés quanto das mãos. Entre as formas clínicas das lesões observou-se a subungueal distal e distrófica total, destacando-se a apresentação clínica subungueal distal com 86% dos casos.

Ao exame da microscopia direta, das escamas ungueais, foi possível observar células de leveduras e/ou hifas, das quais foram isoladas, em superfície de cultura, colônias de 22 amostras clínicas de 19 pacientes. Destas colônias foram identificadas leveduras do gênero *Candida* (69,5%) e *Trichosporon* (13%), bem como fungo não dermatófito *Fusarium solani* (17,5%) - Figura 1.

Discussão

Ao se avaliar a clínica dos pacientes, foi possível verificar maior número de diabéticos tipo 2. Segundo Maraschin e colaboradores (2010), o DM tipo 2 é responsável por mais de 90% dos casos de diabetes acometendo, geralmente, indivíduos com mais de 30 anos.

Entre os pacientes deste estudo, destacam-se as mulheres e idosos. Segundo GODOY-MARTINEZ e colaboradores (2009) a predominância de mulheres acometidas por onicomicoses provavelmente se deve a fatores sócio-culturais, como traumas associados a trabalhos domésticos. Os autores ainda afirmam que a redução do crescimento das unhas e traumas recorrentes são fatores que podem estar relacionados à maior prevalência de onicomicose na população idosa quando comparada a um grupo etário mais jovem.

Nesse estudo foi observado maior prevalência de onicomicoses nos pés dos pacientes diabéticos. Dogra e colaboradores (2002) e Manzano-Gayosso e colaboradores (2008), em estudos realizados com pacientes diabéticos, observaram a prevalência de acometimento fúngico das unhas dos pés, 67,6% e 80% respectivamente, estando de acordo com nosso estudo.

Este fato pode ser explicado devido às unhas dos pés crescerem 50-66% mais lentamente que as unhas das mãos, o que facilita a invasão do agente etiológico, bem como por serem mais submetidas a traumatismos repetidos (EFFENDY et al., 2005; ARENAS et al., 2010).

Cathcart, Cantrell e Elewski (2009) afirmam que apesar da onicomicose ser uma infecção leve e bem tolerada para a maioria das pessoas, para os diabéticos é mais do que uma preocupação estética. Essa infecção está relacionada ao espessamento das unhas, considerado um problema para os pacientes diabéticos, uma vez que pode induzir a formação de úlceras na região subungueal devido a uma maior pressão das lâminas ungueais por sapatos mal ajustados (RICH, 2000).

A apresentação clínica subungueal distal mostrou-se mais freqüente nesse estudo. Ghisi e Santin (2011) afirmam que essa forma clínica é responsável por mais de 90% dos casos de onicomicoses, sendo caracterizada por uma lesão que se inicia na extremidade livre da unha e progride deslocando-se na lâmina superficial, tornando-a esbranquiçada, opaca e apresentando um material de aparência farinácea, resultante da queratólise intensa.

Foi possível obter colônias das amostras clínicas de apenas 19 pacientes com onicomicose, apresentando exame direto positivo para leveduras ou fungos filamentosos. Este fato pode estar relacionado à ocorrência de microrganismos contaminantes na amostra clínica,

os quais apresentavam crescimento rápido, inibindo o desenvolvimento lento do agente etiológico da lesão ou pode ser explicado pelo uso prévio de antifúngicos (LIMA et al., 2008).

Entre os agentes etiológicos mais observados neste estudo, destaca-se *Candida albicans*. O mesmo achado foi verificado por alguns autores em seus trabalhos, os quais apontam essa espécie fúngica como a mais comumente isolada de onicomicoses (MIRANDA et al., 2005; ASADI; DEHGHANI; SHARIF 2009).

O diagnóstico micológico, com a identificação das espécies envolvidas, é essencial na busca de tratamento mais específico das onicomicoses. A detecção e divulgação da diversidade de espécies fúngicas, agentes de onicomicoses, tanto em pacientes com imunodepressão como em hospedeiros imunocompetentes, poderá contribuir para instituição da terapêutica correta nas diferentes apresentações clínicas dessa micose (LIMA et al., 2008).

A alta prevalência de infecções fúngicas em diabéticos, bem como suas complicações, associada a um número crescente de espécies resistentes a antifúngicos padrões, leva a considerar a introdução do exame micológico nos métodos de avaliação da condição clínica de diabéticos, uma vez que pode ser extremamente útil no controle de infecções sistêmicas (DROZDOWSKA; DRZEWSKI, 2008).

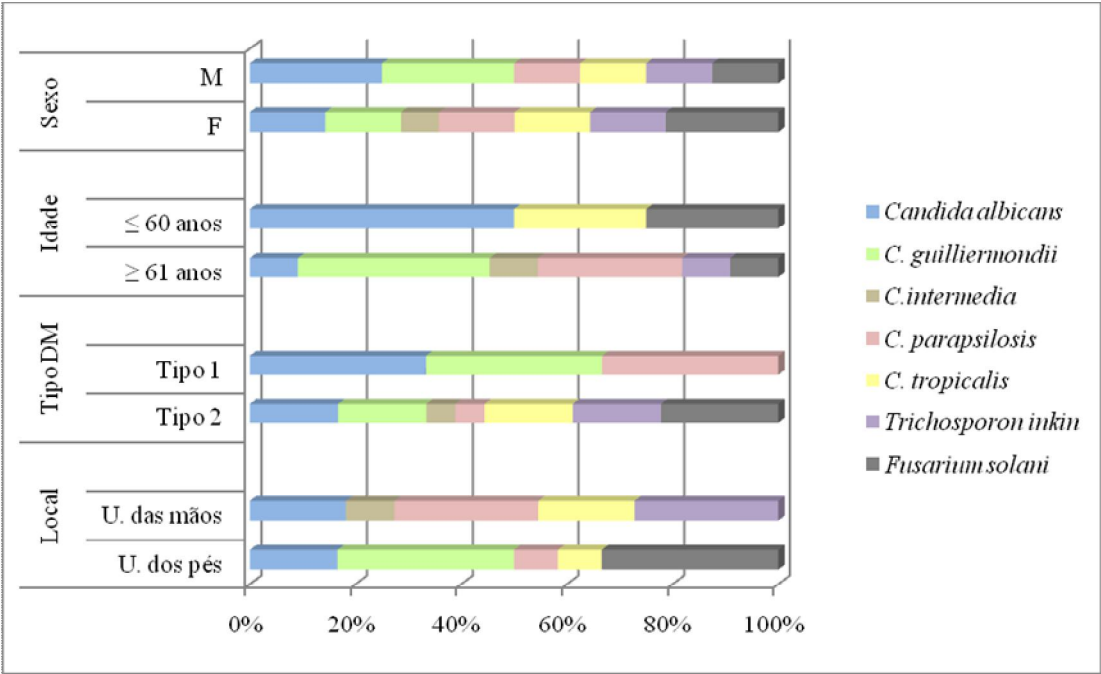


Figura 1. Distribuição das espécies fúngicas de acordo com sexo, idade, tipo de diabetes e localização da lesão nos pacientes diabéticos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse referente a este artigo.

**5 MICOSES SUPERFICIAIS ASSOCIADAS AOS POLIMORFISMOS NO ÉXON 1
DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* ²**

²Trabalho a ser submetido para publicação como Chianca, M.M., Cordeiro, L.H.O., Santos, V.M., Cruz, Macedo, G.M.C., H.L.A., Domingos, I.F., Bezerra, M.A.C., Crovella, S., Neves, R.P.

Resumo

Lectina Ligadora de Manose (MBL) é uma glicoproteína que desempenha importante efeito antimicrobiano através da capacidade de reconhecer carboidratos presentes nas superfícies de patógenos. Polimorfismos das regiões estruturais do gene *MBL2* estão associados à deficiência de MBL sérica funcional, com consequente aumento da frequência e gravidade das infecções, entre estas as de etiologia fúngica. Indivíduos portadores de diabetes mellitus apresentam-se como um grupo mais susceptível ao desenvolvimento dessas infecções, porém a razão para esta condição ainda não está esclarecida. O presente estudo apresenta como propósito correlacionar susceptibilidade às micoses superficiais no diabetes aos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*. Avaliamos 131 diabéticos de três centros hospitalares de Recife, Brasil. Um grupo controle sadio, pertencente a um banco de dados, foi utilizado para realização da comparação estatística. Dos pacientes avaliados, 31 apresentaram acometimento fúngico, sendo mais freqüente a faixa etária superior aos 60 anos (80,6%) nesse grupo, e diabéticos tipo 2 (87%). A micose superficial foi o único tipo de infecção fúngica observada, com maior incidência de onicomicose (93,5%), maior frequência de unhas dos pés afetadas (65,5%) e mulheres (62%). Entre os agentes etiológicos, as espécies de *Candida* foram as mais frequentes (64%). Após genotipagem, ao se comparar o grupo diabéticos com micose ao controle, foi observada maior prevalência do genótipo O/O no primeiro grupo ($p=0.046$). Ao comparar os outros grupos não foi observada significância estatística. A presença dos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2* parece ser um modulador genético que predispõe portadores de diabetes *mellitus* a micoses superficiais.

Palavras-chave: Lectina ligadora de manose. Gene *MBL2*. Diabetes *mellitus*. Micoses superficiais.

Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica devido a defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou ambos (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009). O retardo no início do tratamento do diabetes predispõe ao desenvolvimento de diversas afecções como doenças cardiovasculares, retinopatias, neuropatias, nefropatias, doença vascular periférica, aterosclerose, doença cerebrovascular, hipertensão e susceptibilidade a infecções (ARSA et al., 2009).

As causas da maior susceptibilidade às infecções em diabéticos não estão esclarecidas, todavia, é possível que haja relação com a deficiência imunológica (FOSS et al., 2005) caracterizada por depressão da atividade dos neutrófilos, macrófagos e menor eficiência da imunidade celular. Dessa forma, o diabetes tem sido aceito como um importante fator de risco ao desenvolvimento de micoses (ROCHA et al., 2002; OKUBO et al., 2008). Neste contexto, complicações em diabéticos podem estar relacionadas à concentração sérica e função da lectina ligadora de manose (MBL), em dependência de polimorfismos do gene *MBL2*.

A MBL é uma proteína codificada pelo gene *MBL2*, localizado no braço q11.2-q21 do cromossomo 10 formado por quatro éxons (CHAGAS et al., 2005). Essa proteína é o componente central da ativação da via das lectinas do sistema complemento responsável por mediar um efeito antimicrobiano com a formação do complexo de ataque à membrana (GARCIA-LAORDEN et al., 2008) ou exercer papel de opsonina promovendo a fagocitose de microrganismos patogênicos (SILVA, 2010), através do reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de patógenos (IP et al., 2009).

Três polimorfismos no éxon 1 (códon 52, 54 e 57) têm sido associados à deficiência da MBL. Neste sentido, polimorfismo no gene *MBL2*, com diminuição dos níveis séricos de MBL resulta em maior susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (GRANELL et al., 2006). Assim, o propósito desse estudo foi correlacionar susceptibilidade às micoses superficiais no diabetes *mellitus* aos polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*.

Materiais e Métodos

Pacientes e Amostras Clínicas

Foram avaliados pacientes com história de diabetes *mellitus* do Hospital das Clínicas (HC), Hospital Barão de Lucena (HBL) e do Instituto Brasileiro de Diabetes (IBRADI), localizados em Recife, Pernambuco, a fim de se investigar lesões sugestivas de micoses. O projeto foi previamente aceito pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE protocolado com o nº 307/10 e registrado no SISNEP FR – 366987. Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Nos casos sugestivos de micoses foi realizada coleta de amostras clínicas, após limpeza cuidadosa da área acometida com etanol a 70%, com auxílio de bisturi e placa de Petri, previamente esterilizados. E, quando necessário, realizada a técnica de Porto (1953), com auxílio de fita adesiva e lâmina.

Diagnóstico Micológico

Para o exame direto, as amostras clínicas foram processadas com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio (KOH). Concomitantemente, foram semeadas, em duplicata, na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco) adicionado de uma fonte de lipídios (1%) e cloranfenicol (50mg/L), mantidas às temperaturas de 30°C e 37°C por um período de até 20 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e em seguida, identificadas segundo características morfofisiológicas e bioquímicas (BARNETT; PAINE; YARROW, 2000; DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

*Análise dos Polimorfismos do gene *MBL2**

Foram utilizados três grupos de indivíduos para análise dos polimorfismos: grupo de pacientes com diabetes e micoses, grupo representado por pacientes com diabetes e ausência de infecção fúngica e o grupo controle composto de 100 amostras de DNA extraído de indivíduos sadios, pertencentes a um banco do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Entende-se como indivíduo sadio nesse estudo, todo aquele sem diabetes *mellitus* e sem lesões fúngicas.

O DNA foi extraído do sangue periférico total dos pacientes utilizando o kit de extração AccuPrep® Genomic DNA, de acordo com as instruções do fabricante.

A genotipagem dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no éxon 1 do gene *MBL2* foi realizada utilizando primers projetados com o Primer Express 1.5 Software Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), “primer forward” (5'-AGGCATCAACGGC TTCCA-3') e “primer reverse” (5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3').

As reações de amplificações foram realizadas, de acordo com Arraes e colaboradores (2006), em um volume final de 25 µL com Master Mix 1X SYBR Green I® (Eroclone, Milan, Italy), 150 picomoles do iniciador *forward*, 50 picomoles do iniciador *reverse* e 10 ng de DNA genômico. As condições de ciclagem foram os seguintes: 95°C por 10 minutos, seguida por 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, repetido 45 vezes no aparelho Rotor Gene-3000 (Cobertt Research Mortlake, Sydney, Australia). Ao final da PCR, realizou-se protocolo de curva de *Melting*, o qual incluiu aquecimento lento de 60°C a 95°C em etapas de 0,2°C com intervalo de 8 segundos entre as etapas. O perfil da curva de fusão foi obtido usando software de dissociação do aparelho *Corbett Rotor Gene*TM RG3000 (Uniscience Cobertt Research). De acordo com a temperatura de fusão foram analisados os genótipos do *MBL2*: AA (um pico de $83.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$), AO (dois picos de 82.6 ± 0.3 e $80.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) e OO (um pico de $81.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

Análise Estatística

Para correlacionar as frequências gênicas com o aumento da susceptibilidade às infecções fúngicas foi utilizado o Teste do Qui-quadrado com a correção do Teste Exato de Fisher. O intervalo de confiança (IC) será de 95%, portanto valores de “p” menores ou iguais a 0,05 foram aceitos.

Resultados

Grupos de Estudo

Durante o período do estudo, foram coletadas amostras sanguíneas de 100 pacientes diabéticos com ausência de lesões fúngicas e 31 amostras de pacientes diabéticos com suspeita clínica de infecção fúngica.

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Os parâmetros observados para avaliação clínica e epidemiológica agruparam sexo, idade, tipo de diabetes, sítios acometidos (Tabela 1) e agentes etiológicos de micoses (Figura 1).

O grupo de pacientes diabéticos com micose compreendeu 20 mulheres (64,5%) e 11 homens (35,5%). A média de idade foi de 63 anos, variando dos 30 aos 83 anos, sendo faixa etária ≥ 61 anos mais freqüente (80,6%). Apresentando-se nesta faixa etária maior prevalência de mulheres (68%). Avaliou-se o tipo de diabetes nesses pacientes, apresentando-se o DM tipo 2 mais prevalente (87%) quando comparado ao DM tipo 1 (13%).

Dos 31 pacientes do grupo diabético com suspeita clínica de micose, todos tiveram confirmação da suspeita através da observação de estruturas fúngicas em parasitismo. Foi possível isolar o agente etiológico de 20 pacientes deste grupo.

A micose de origem superficial foi a única apresentação clínica observada, sendo a onicomicose a representante do maior número de casos (93,5%), com as unhas dos pés mais freqüentemente afetadas (65,5%), bem como pacientes do sexo feminino (62%). As espécies de *Candida* foram os agentes etiológicos predominantes nas micoses, como ilustrado na figura 1.

O grupo de pacientes diabéticos sem envolvimento fúngico consistiu de 70 mulheres (70%) e 30 homens (30%). A média de idade foi de 52 anos, variando dos 18 aos 80 anos, prevalecendo idade ≥ 61 anos (31%). Deste total de pacientes acima de 60 anos de idade, foi possível observar a prevalência de mulheres (77,5%). Neste grupo foi possível avaliar pacientes com dois tipos de diabetes *mellitus*, o DM tipo 1 e o DM tipo 2. O DM tipo 1 apresentou uma frequência de 13%, enquanto o DM tipo 2 mostrou-se mais incidente com 87% dos casos.

O grupo controle incluiu 69 mulheres (69%) e 31 homens (31%) saudáveis. A média de idade deste grupo foi de 27 anos, variando dos 18 aos 51 anos, com prevalência na faixa etária dos 21 aos 30 anos (71%).

Tabela 1. Caracterização clínica e epidemiológica dos grupos em estudo quanto a sexo, idade, tipo de diabetes e sítios acometidos.

Parâmetros	Grupos		
	Diabéticos com micose n = 31	Diabéticos sem micose n = 100	Controle n = 100
Sexo			
Feminino	20 (64,5%)	70 (70%)	69 (69%)
Masculino	11 (35,5%)	30 (30%)	31 (31%)
Idade (anos)			
≤ 20	-	4 (4%)	9 (9%)
21 a 30	1 (3,2%)	6 (6%)	71 (71%)
31 a 40	1 (3,2%)	14 (14%)	14 (14%)
41 a 50	-	15 (15%)	5 (5%)
51 a 60	4 (13%)	30 (30%)	1 (1%)
≥ 61	25 (80,6%)	31 (31%)	-
Tipos de Diabetes			
DM tipo 1	4 (13%)	13 (13%)	-
DM tipo 2	27 (87%)	87 (87%)	-
Sítios acometidos			
Unha do pé	19 (56%)	-	-
Unha da mão	13 (38%)	-	-
Braço	1 (3%)	-	-
Nádegas	1 (3%)	-	-

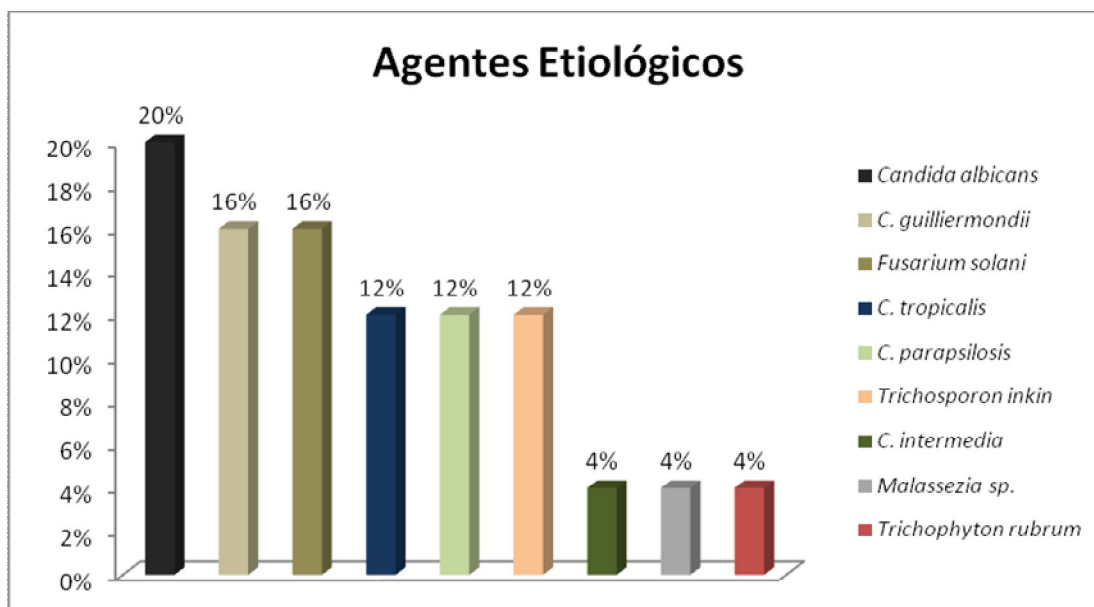
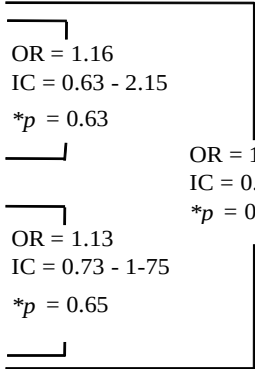


Figura 1. Agentes etiológicos de micoses superficiais em pacientes com diabetes *mellitus*.

Genotipagem dos Pacientes

Após genotipagem para o *MBL2* foi possível observar maior prevalência do alelo selvagem A em todos os grupos em estudo, apresentando o grupo diabéticos com micose um resultado de 67,7%, o grupo diabéticos sem micose 71% e o grupo controle 73,5%. Ao se realizar a análise estatística, observou-se que quando comparado ao grupo controle, os grupos diabéticos sem micose ($p=0.65$) e diabéticos com micose ($p=0.41$) não apresentaram valores estatisticamente significantes, demonstrando não haver diferença nas frequências alélicas. O mesmo foi observado quando comparado o grupo diabéticos sem micose ao diabéticos com micose - $p=0.63$ (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição alélica para o gene *MBL2* nos grupos diabéticos com micose, diabéticos sem micose e controle.

Grupos		Alelos <i>MBL 2</i>	
		A	O
Diabéticos com micose n = 31		42/62 (67,7%)	20/62 (32,3%)
Diabéticos sem micose n = 100		142/200 (71%)	58/200 (29%)
Controle n = 100		147/200 (73,5%)	53/200 (26,5%)

NOTA: * p = Teste exato de Fisher; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança

Avaliando-se as frequências genótípicas para os grupos em estudo, verificou-se para o grupo diabéticos com micose, 48,4% dos pacientes com genótipo A/A, 38,7% genótipo A/O e 12,9% genótipo O/O. Para o grupo diabéticos sem micose, 49% genótipo A/A, 44% genótipo A/O e 7% genótipo O/O. E para o grupo controle, 49% dos indivíduos com genótipo A/A, 49% com genótipo A/O e 2% genótipo O/O (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição genotípica para o gene *MBL2* nos grupos diabéticos com micose, diabéticos sem micose e controle.

Grupos	Genótipos <i>MBL2</i>		
	A/A	A/O	O/O
Diabéticos com micose n = 31 OR = 1.86 IC = 0.48 - 7.25 <i>*p</i> = 0.53	15/31 (48,4%)	12/31 (38,7%)	4/31 (12,9%)
Diabéticos sem micose n = 100 OR = 3.50 IC = 0.69 - 17.7 <i>*p</i> = 0.22	49/100 (49%)	44/100 (44%)	7/100 (7%)
Controle n = 100	49/100 (49%)	49/100 (49%)	2/100 (2%)

NOTA: **p* = Teste exato de Fisher; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança

Foi observado que as diferenças genótípicas entre os grupos diabéticos com micose e diabéticos sem micose não foram estatisticamente significantes, apresentando um valor de *p* igual a 0.53. Da mesma forma quando comparado o grupo diabéticos sem micose ao grupo controle, não foi possível observar significância estatística (*p*=0.22). Porém, ao se comparar o grupo diabéticos com micose ao grupo controle, foi encontrada uma razão de chances para associação entre diabetes *mellitus* e micose (OR=6.5) na presença do genótipo O/O, apresentando um valor de *p* igual a 0.046, demonstrando diferença significativa.

Discussão

Onicomicose foi a micose superficial, de maior prevalência, diagnosticada neste estudo. A infecção das unhas é um processo muito freqüente causada por diferentes espécies de dermatófitos, leveduras e fungos não-dermatófitos (GARMENDIA; VIEDMA; ARZA, 2008). Segundo Arenas e colaboradores (2010), esta condição clínica é o distúrbio mais comum das unhas afetando principalmente as unhas dos pés (90%) e, ocasionalmente, as unhas das mãos (10%), o que corrobora nosso estudo.

As unhas dos pés são mais freqüentemente afetadas, provavelmente, devido ao crescimento lento, o que facilita a invasão do agente etiológico, bem como por serem mais submetidas a traumatismos repetidos (ARENAS et al., 2010).

A presença das infecções fúngicas, como a onicomicose, pode ter resultados negativos significativos sobre o desenvolvimento emocional e social. Além de causarem prejuízo estético, refletem na auto-estima e discriminação social, uma vez que podem vir a serem tratadas como pessoas de maus hábitos de higiene e prováveis fontes de infecção (BALLESTÉ; MOUSQUÉS; GEZUELE, 2003).

Neste estudo, a presença de fungos patogênicos nas lâminas ungueais teve maior incidência em pacientes do sexo feminino. Porém, vale ressaltar que este sexo esteve mais presente na nossa amostragem. Alguns autores também relataram maior incidência de mulheres acometidas por onicomicose quando comparado aos homens (ARAÚJO et al., 2003; SANTOS; ANDRIOLI, 2005). Martelozo, Guilhermetti e Svidzinski (2005) afirmam que este fato se deve, provavelmente, à exposição da mulher à umidade por trabalhos domésticos, contato com detergentes agressivos e com a prática de manicure e pedicure, o que facilitam a infecção.

Alguns estudos associam a maior prevalência da micose com o avançar da idade (ROBERTS, 1992; ROSSEW, 1999; SZEPIETOWSKI et al., 2006), fato confirmado neste trabalho, o qual demonstrou ser crescente a presença de micose com o aumento da idade, estando os pacientes com idade igual ou superior aos 61 anos como o grupo de maior acometimento fúngico.

Segundo Ghisi e Santin (2011), as infecções fúngicas ganharam considerável importância ao longo da última década, devido ao aumento significativo na incidência de agentes oportunistas, entre os quais se destacam as leveduras.

Foi possível isolar colônias, das amostras clínicas, de apenas 20 pacientes do grupo de pacientes diabéticos com micose. Fato que pode ser explicado pela ocorrência de

microrganismos contaminantes na amostra clínica, os quais apresentavam crescimento rápido, inibindo o desenvolvimento lento do agente etiológico da lesão ou pelo uso prévio de antifúngicos (LIMA et al., 2008).

Das colônias isoladas destacam-se leveduras do gênero *Candida*, sobretudo nas onicomicoses, prevalecendo *C. albicans*. Também outros autores verificaram que *C. albicans* foi a espécie fúngica mais comumente isolada de onicomicoses (MIRANDA et al., 2005; ASADI; DEHGHANI; SHARIF, 2009).

A onicomicose é responsável por até 50% das infecções em unhas (VEER; PATWARDHAN; DAMLE, 2007) e pode representar um problema de saúde ainda mais grave para pacientes imunossuprimidos (KAUR; KASHYAP; BHALLA, 2008), como aqueles que apresentam como doença de base, diabetes *mellitus*. Onicomicose nesse grupo de pacientes é considerada fator predisponente ao desenvolvimento de úlceras nos pés (BOYKO et al., 2006), uma vez que a lâmina ungueal sofre espessamento nesse tipo de micose, podendo resultar em pressão por calçados mal ajustados (RICH, 2000). Além de poder ocasionar uma inflamação da derme e camada subcutânea da pele (ROUJEAU et al., 2004), bem como pode levar a amputação dos membros inferiores (DROZDOWSKA; DRZEWOSKI, 2008).

Entre os pacientes diabéticos, tanto no grupo sem micose quanto no grupo com micose, desse estudo, o que se observa é o maior número de mulheres com idade igual ou superior aos 61 anos. Wild e colaboradores (2004) afirmam que o maior número de mulheres idosas na maioria das populações associado ao fato da prevalência de diabetes aumentar com a idade justifique esse achado.

Entre os dois grupos de pacientes diabéticos foi possível observar o predomínio de diabetes *mellitus* tipo 2. Este é o tipo de diabetes mais prevalente responsável por mais de 90% dos casos de DM (BRASIL, 2006; MARASCHIN et al., 2010; ADA, 2011). Aproximadamente 150 milhões de pessoas, em todo o mundo, são afetadas pelo DM tipo 2 e a estimativa indica que este número deverá dobrar nos próximos 20 anos (FREEMAN; COX, 2006).

Foi possível observar associação dos SNPs no éxon 1 do gene *MBL2* com susceptibilidade a infecções fúngicas nos pacientes com DM. A maior frequência de homozigotos variantes no grupo diabéticos com micose ao se comparar com o grupo controle, com relevância estatística $p=0,046$, sugere uma predisposição de pacientes diabéticos, com polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*, em desenvolver micose.

Tem sido demonstrado que a MBL pode se ligar a manose ou outros carboidratos presentes na superfície de numerosos microrganismos e ativar o complemento através da via das lectinas para lisar esses patógenos e promover a fagocitose (HU et al., 2010). Brouwer e colaboradores (2008) relataram que a MBL tem uma contribuição significativa na opsonofagocitose das leveduras, após ativação da via das lectinas do sistema complemento.

Porém, três polimorfismos pontuais no éxon 1 do gene *MBL2* podem prejudicar a expressão da proteína MBL, conduzindo a formação de moléculas pequenas, não funcionais, o que pode ocasionar recorrentes processos infecciosos (GARRED et al., 2006; BROUWER et al., 2008).

Alguns estudos realizados correlacionam a presença de polimorfismos no gene *MBL2* ao desenvolvimento de micoses como aspergilose pulmonar necrotizante crônica (CROSDALE et al., 2001), coccidioidomicose sintomática (AMPEL et al., 2009), candidíase vulvovaginal e sua forma recorrente (BABULA et al., 2003; LIU; LIAO; LIU, 2006; GIRALDO et al., 2007) e aspergilose invasiva aguda (LAMBOURNE et al., 2009). Entretanto, Milanese e colaboradores (2008) demonstraram no estudo realizado em pacientes com diagnóstico de infecções vaginais recorrentes, entre elas candidíase vulvovaginal, que não houve correlação entre polimorfismos funcionais no primeiro éxon do gene *MBL2* e esta infecção.

Foi também possível verificar um aumento do número de indivíduos com a presença do genótipo O/O quando comparamos o grupo controle aos diabéticos sem micose. Porém, não foi possível atingir significância estatística.

Tsutsumi e colaboradores (2003), estudaram possível relação entre a ocorrência de diabetes tipo 1 e polimorfismo no gene *MBL2* e constataram que a frequência do alelo variante apresentava-se maior quando comparado ao grupo saudável, porém não obtiveram resultados estatisticamente significantes.

Em estudo realizado também com diabéticos tipo 1, Araújo e colaboradores (2007) observaram que o alelo variante O apresentava-se mais freqüente nesses pacientes quando comparados ao grupo controle saudável, sugerindo maior risco de desenvolver a doença quando na presença do polimorfismo do gene *MBL2*. Os autores afirmam que mais estudos devem ser realizados buscando correlacionar as funções da imunidade inata na ocorrência do diabetes tipo 1 para compreensão da patogênese dessa doença.

Demonstramos que a presença de polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*, com redução da produção de MBL funcional, pode tornar pacientes diabéticos mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas. O conhecimento da deficiência dessa proteína é uma

importante ferramenta para pacientes imunossuprimidos, como diabéticos, uma vez que estudos vêm demonstrando a possibilidade da reposição de quantidades terapêuticas da proteína em busca da melhora no quadro clínico dos pacientes.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse referente a este artigo.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

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 associação entre polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2* e susceptibilidade a micoses superficiais em indivíduos com diabetes *mellitus*.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

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, L.M.B., Britto, M.M.S., Cruz, T.R.P. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 6, p. 509-518, 2000.

Araújo, A.J.G., Souza, M.A.J., Bastos, O.M.P., Oliveira, J.C. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.3, p. 299-308, 2003.

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 an adolescents. **Human Immunology**, v. 68, n. 9, p. 739-743, 2007.

Araújo, M.S.M.. **Investigação do polimorfismo do éxon-1 do gene MBL (Mannose-Binding Lectin) em pacientes portadores de tuberculose**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009. Disponível em: <http://www.baip.ufpa.br/arquivos_baip/teses_dissertacoes/mauro_sergio_moura_de_araujo.pdf>. Acesso em 29 dez 2011.

Arenas, R., Bonifaz, A., Padilla, M.C., Arce, M., Atoche, C., Barba, J., Campos, P., Fernández, R., Mayorga, J., Nazar, D., Ocampo, J. Onychomycosis. A Mexican survey. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 611-614, 2010.

Arraes, L.C., Souza, P.R., Bruneska, D., Castelo Filho, A., Cavada, B.S., Lima Filho, J.L., Crovella, S. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 719-723, 2006.

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.

Asadi, M.A., Dehghani, R., Sharif, M.R. Epidemiologic study of onychomycosis and tinea pedis in Kashan, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 61-64, 2009.

Babula, O., Lazdane, G., Kroica, J., Ledger, W.J., Witkin, S.S. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in latvian women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 733-737, 2003.

Ballesté, R., Mousqués, N., Gezuele, E. Onicomycosis: Revisión del tema. **Revista Médica del Uruguay**, v. 19, n. 2, p. 93-106, 2003.

Barceló, A., Aedo, C., Rajpathak, S., Robles, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 1, p. 19-28, 2003.

Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1152p.

Bastos Jr, M.A.V., Oliveira, M.M.S., Castro, S.H., Cunha, E.F., Moraes, E.R.S., Ruzzani, S., Gomes, M.B. Fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus pós-transplante renal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 2, p. 271-277, 2005.

Bem, A.F., Kunde, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185-191, 2006.

Bona, S.F., Barbosa, M.A.R., Ferraz, C.L.H., Guarita, L.K.S., Nina, R.V.A.H., Brabosa, N.M.R.F., Ferraz, T.M.B.L. Prevalência do pé diabético nos pacientes atendidos na emergência de um hospital público terciário de Fortaleza. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2010.

Boniotto, M., Braidà, L., Spanò, A., Pirulli, D., Baldas, V., Trevisiol, C., Not, T., Tommasini, A., Amoroso, A., Crovella, S. Variant mannose-binding lectin alleles are associated with celiac disease. **Immunogenetics**, v. 54, p. 596-598, 2002.

Bouwman, L.H., Roep, B.O., Roos, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Human Immunology**, v. 67, p. 247-256, 2006.

Boyko, E.J., Ahroni, J.H., Cohen, V., Nelson, K.M., Heagerty, P.J. Prediction of diabetic foot ulcer occurrence using commonly available clinical information. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1202-1207, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diabetes mellitus**. Brasília, 2006. 56p.

Brouwer, N., Dolman, K.M., Houdt, M.V., Sta, M., Roos, D., Kuijpers, T.W. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis o yeasts but not of bacteria despite MBL binding. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 4124-4132, 2008.

Bulzico, D.A. **Avaliação da velocidade de onda de pulso aórtico em mulheres com gestação complicada por Diabetes Mellitus Gestacional**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado

em Clínica Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em:
<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Avaliacao_velocidade_Daniel_Alves_Bulzico.pdf>. Acesso em 20 out 2011.

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 Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 315-321, 2008.

Cambuim, I.I.F.N., Macêdo, D.P.C., Delgado, M., Lima, K., Mendes, G.P., Souza-Motta, C.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J., Magalhães, O.M.C., Queiroz, L.A., Neves, R.P. Avaliação clínica e micológica de onicomiose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.

Carréra, M.C., Moura, P., Crovella, S., Souza, P.R.E, Alencar, L.C.A., Sarinho, E. High polymorphism of the *MBL2* gene in patients with atopic dermatitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 105, p. 39-42, 2010.

Carrillo-Muñoz, A.F., Tur-Tur, C., Hernández-Molina, J.M., Santos, P., Cárdenes, D., Giusiano, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

Carvalho, E.G. **Investigação da Lectina Ligante de Manose (MBL) em pacientes com doença celíaca**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em:
<http://www.farmaceuticas.ufpr.br/pdf/teses_resumos/Elisandra%20Grangeiro%20de%20Carvalho_dis.pdf>. Acesso em 12 out 2011.

Cathcart, S., Cantrell, W., Elewski, B.E. Onychomycosis and diabetes. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, p. 1119-1122, 2009.

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.

Chagas, K.N., Steffensen, R., Ferrão, M.S.C., Arruk, V.G., Berg, H.A., Dellanegra, M., Juliano, Y., Duarte, A.J.S., Rutz, R., Kirschfink, M., Jensenius, J.C., Grumach, A.S. Avaliação da concentração sérica de MBL e sua atividade funcional na transmissão materno-fetal do HIV. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 28, n. 6, p. 284-291, 2005.

Christiansen, O.B., Kilpatrick, D.C., Souter, V., Varming, K., Thiel, S., Jensenius, J.C. Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 49, p. 193-196, 1999.

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.

Crosdale, D.J., Poulton, K., V., Ollier, W.E., Thomson, W., Denning, D.W. Mannose-binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 653-656, 2001.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2.ed. Amer Society for Microbiology, 2000. 1126p.

Dean, M.M., Minchinton, R.M., Heatley, S., Eisen, D.P. Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. **Journal of Clinical Immunology**, v. 25, n. 4, p. 346-352, 2005.

Denholm, J.T., McBryde, E.S., Eisen, D.P. Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, p. 84-90, 2010.

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.

Diabetes Atlas. 2003. **International Diabetes Federation**. 2.ed. Brussels.

Dogra, S., Kumar, B., Bhansali, A., Chakrabarty, A. Epidemiology of onychomycosis in patients with diabetes mellitus in India. **The International Society of Dermatology**, v. 41, p. 647-651, 2002.

Dommett, R.M., Klein, N., Turner, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: Past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, p. 193-209, 2006.

Drozowska A, Drzewoski J. Mycoses in diabetes - difficult diagnostic and therapeutic problem. Review of literature. **Diabetologia**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2008.

Effendy, I., Lecha, M., Chauvin, M.F., Chiacchio, N.D., Baran, R. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 1, p. 8-12, 2005.

Eisen, D.P., Minchinton, R.M. Impact of Mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1496-1505, 2003.

Eisen, D.P., Dean, M.M., Boermeester, M.A., Fidler, K.J., Gordon, A.C., Kronborg, G., Kun, J.F.J., Lau, Y.L., Payeras, A., Valdimarsson, H., Brett, S.J., Ip, W.K.E., Mila, J., Peters, M.J., Saevarsdottir, S., Till, W.J.O.V., Hinds, C.J., McBryde, E.S. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. **CID**, v. 47, p. 510-516, 2008.

Faergemann, J., Correia, O., Nowicki, R., Ro, B.I. Genetic predisposition-understanding underlying mechanisms of onychomycosis. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 1, p. 17-19, 2005.

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.

Foss, N.T., Polon, D.P., Takada, M.H., Foss-Freitas, M.C., Foss, M.C. Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 677-682, 2005.

Freeman, H., Cox, R.D. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 202-209, 2006.

Garcia-Laorden, M.I., Sole-Violan, J., Castro, F.R., Aspa, J., Briones, M.L., Garcia-Saavedra, A., Rajas, O., Blanquer, J., Caballero-Hidalgo, A., Marcos-Ramos, A., Hernandez-Lopez, J., Rodriguez-Gallego, C. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 2, p. 368-374, 2008.

Garmendia, J.L., Viedma, P.I., Arza, J.M. Onicomicosis: diagnóstico y tratamiento. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud**, v. 32, n. 3, p. 83-92, 2008.

Garred, P., Brygge, K., Sorensen, C.H., Madsen, H.O., Thiel, S., Svejgaard, A. Mannan-binding protein levels in plasma and upper-airways secretions and frequency of genotypes in children with recurrence of otitis media. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, p. 99-104, 1993.

Garred, P., Pressler, T., Lanng, S., Madsen, H.O., Moser, C., Laursen, I., Balstrup, F., Koch, C., Koch, C. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. **Pediatric Pulmonology**, v. 33, p. 201-207, 2002.

Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R., Madsen, H.O. Mannose-binding lectin and its genetics variants. **Genes and Immunity**, v. 7, p. 85-94, 2006.

Garred, P., Honoré, C., Ma, Y.J., Munthe-Fog, L., Hummelshøj. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3 - The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 2737-2744, 2009.

Ghisi, J., Santin, N.C. Avaliação do possível crescimento de fungos em amostras de lixas de unha metálicas coletadas em centros de estética e residências do município de Campos Novos, SC. **Unesc & Ciência - ACBS**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2011.

Giraldó, P.C., Babula, O., Gonçalves, A.K.S., Linhares, I.M., Amaral, R.L., Ledger, W.J., Witkin, S.S. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 109, n. 5, p. 1123-1128, 2007.

Godoy-Martinez, P., Nunes, F.G., Tomimori-Yamashita, J., Urrutia, M., Zaror, L., Silva, V., Fischman, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, p. 111-116, 2009.

Góes, A.P.P., Vieira, M.R.R., Liberatore Júnior, R.D.R. Diabetes mellitus tipo 1 no contexto familiar e social. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, p. 124-8, 2007.

Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D., Peterson, C.M., Sacks, D.B. Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 7, p. 1761-1773, 2004.

González-Avila, M., Gómez-Gómez, J.V., Taxis, A.P.E., Imbert-Palafox, J.L., Becerril-Flores, M.A., Blasco, J.L. Uncommon Fungi Isolated from Diabetic Patients Toenails With or Without Visible Onychomycoses. **Mycopathologia**, v. 172, n. 3, p. 207-213, 2011.

Granel, M., Urbano-Ispizua, A., Suarez, B., Rovira, M., Fernández-Avilés, F., Martínez, C., Ortega, M., Uriburu, C., Gaya, A., Roncero, J.M., Navarro, A., Carreras, E., Mensa, J., Vives, J., Rozman, C., Montserrat, E., Lozano, F. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. **Experimental Hematology**, v. 34, p. 1435-1441, 2006.

Gross, J.L., Silveiro, S.P., Camargo, J.L., Reichelt, A.J., Azevedo, M.J. Diabetes Melito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

Grupo de Trabalho Internacional sobre o pé diabético. **Consenso Internacional sobre o Pé Diabético**. Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal. Brasília, 2001.

Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., Gal, P., Schwaeble, W.J., Sim, R.B., O'Connor, C.D., Hajela, K. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. **Immunology**, v. 129, p. 482-495, 2009.

Gupta, K., Gupta, R.K., Hajela, K. Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, p. 431-440, 2008.

Hansen, T.K., Tarnow, L., Thiel, S., Steffensen, R., Stehouwer, C.D., Schalkwijk, C.G., Parving, H.H., Flyvbjerg, A. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 1570-1576, 2004.

Hovind, P., Hansen, T.K., Tarnow, L., Thiel, S., Steffensen, R., Flyvbjerg, A., Parving, H.H. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes. An inception cohort study. **Diabetes** v. 54, p. 1523-1527, 2005.

Hu, Y., Wu, D., Tao, R., Shang, S. Association between mannose-binding lectin gene polymorphism and pediatric cytomegalovirus infection. **Viral Immunology**, v. 23, n. 4, p. 443-447, 2010.

Ip, W.K., Lau, Y.L., Chan, S.Y., Mok, C.C., Chan, D., Tong, K.K., Lau, C.S. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 8, p. 1679-1687, 2000.

Ip, W.K.E., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Stuart, L.M. Mannose-binding lectin and innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 9-21, 2009.

Jensenius, J.C., Jensen, P.H., McGuire, K., Larsen, J.L., Thiel, S. Recombinant mannan-binding lectin (MBL) for therapy. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p.763-767, 2003.

Kafaie, P., Noorbala, M.T. Evaluation of onychomycosis among diabetic patients of Yazd diabetic center. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 20, p. 217-221, 2010.

Kalil, K.F. **Polimorfismo do éxon 1 do gene da Lectina Ligadora de Manose (MBL) em indivíduos expostos à malária causada por Plasmodium vivax**. 2006. 132f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006. Disponível em: <http://www.baip.ufpa.br/arquivos_baip/teses_dissertacoes/karolina_fonseca_kalil.pdf>. Acesso em 2 jan 2012.

Kaunisto, M.A., Sjölin, L., Sallinen, R., Pettersson-Fernholm, K., Saraheimo, M., Fröjdö, S., Forsblom, C., Fagerudd, J., Hansen, T.K., Flyvbjerg, A., Wessman, M., Groop, P.H. Elevated MBL concentrations are not an indication of association between the MBL2 gene and type 1 diabetes or diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 57, p. 1710-1714, 2009.

Kaur, R., Kashyap, B., Bhalla, P. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, p. 108-116, 2008. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2008;volume=26;issue=2;spage=108;epage=116;aulast=kaur>>. Acesso em 26 nov 2011.

Kilpatrick, D.C. Phospholipid-binding activity of human mannan-binding lectin. **Immunology Letters**, v. 61, p. 191-195, 1998.

Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Vaccari, E.M.H., Melo, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1103p.

Lambourne, J., Agranoff, D., Herbrecht, R., Troke, P.F., Buchbinde, A., Willis, F., Letscher-Bru, V., Agrawal, S., Doffman, S., Johnson, E., White, P.L., Barnes, R.A., Griffin, G., Lindsay, J.A., Harrison, T.S. Association of mannan-binding lectin deficiency with acute invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1486-1491, 2009.

Lima, K.M., Rêgo, R.S.M., Montenegro, F., Silveira, N.S.S. Espécies fúngicas responsáveis por onicomicose em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 2, p. 107-110, 2008.

Little, R.R., Rohlfing, C.L., Tennill, A.L., Madsen, R.W., Polonsky, K.S., Myers, G.L., Greenbaum, C.J., Palmer, J.P., Rogatsky, E., Stein, D.T. Standardization of C-Peptide measurements. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1023-1026, 2008.

Liu, F., Liao, Q., Liu, Z. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 92, p. 43-47, 2006.

Malhotra, R., Willis, A.C., Lopez Bernal, A., Thiel, S., Sim, R.B. Mannan-binding protein levels in human amniotic fluid during gestation and its interaction with collectin receptor from amnion cells. **Immunology**, v. 82, p. 439-444, 1994.

Manzano-Gayosso, P., Hernández-Hernández, F., Méndez-Tovar, L.J., Palacios-Morales, Y., Córdova-Martínez, E., Bazán-Mora, E., López-Martínez, R. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v. 166, p. 41-45, 2008.

Maraschin, J.F., Murussi, N., Witter, V., Silveiro, S.P. Classificação do Diabete Melito. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. 40-47, 2010.

Marteloza, I.C., Guilhermetti, E., Svidzinski, T.I.E. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2005.

Martiny, F.L. **Análise das variantes polimórficas do éxon 1 do gene que codifica Lectina de Ligação a Manose (MBL2) em pacientes com a artrite reumatóide**. 2011. 38f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <http://tede.pucrs.br/tde_arquivos/3/TDE-2011-06-02T070520Z-3275/Publico/431688.pdf>. Acesso em 23 nov 2011.

Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., Fujita, T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 2637-2642, 2000.

Mayser, P., Freund, V., Budihardja, D. Toenail onychomycosis in diabetic patients. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 10, n. 4, p. 211-220, 2009.

Megia, A., Gallart, L., Fernández-Real, J.M., Vendrell, J., Simon, I., Gutierrez, C., Richart, C. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 10, p. 5081-5087, 2004.

Milanese, M., Segat, L., Seta, F., Pirulli, D., Fabris, A., Morgutti, M., Crovella, S. MBL2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 146-151, 2008.

Miller, M.E., Seals, J., Kaye, R., Levitsky, L.C. A familial, plasma associated defect of phagocytosis: a new cause of recurrent bacterial infections. **The Lancet**, v. 292, p. 60-63, 1968.

Miller, C., Wilgenbusch, S., Michael, M., Chi, D.S., Youngberg, G., Krishnaswamy, G. Molecular defects in the mannose binding lectin pathway in dermatological disease: Case report and literature review. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 8, n. 6, p. 1-9, 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.

Miranda, K.C., Araujo, C.R., Khrais, C.H.A., Lemos, J.A., Costa, C.R., Souza, L.K.H., Passos, X.S., Fernandes, O.F.L., Silva, M.R.R. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 123-128, 2005.

Monticielo, O.A. **Estudos dos polimorfismos da Lectina Ligadora da Manose em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14938/000670197.pdf?sequence=1>>. Acesso em 25 out 2011.

Moraes, S.A., Freitas, I.C.M., Gimeno, S.G.A., Mondini, L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 929-941, 2010.

Morales, J.O., Conejero, A.M.S., Lantigua, L.C., Reboredo, W. Diabetes mellitus. Diagnóstico positivo. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 22, n. 1, 2006.

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.

Nather, A., Bee, C.S., Huak, C.Y., Chew, J.L.L., Lin, C.B., Neo, S., Sim, E.Y. Epidemiology of diabetic foot problems and predictive factors for limb loss. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 22, n. 2, p. 77-82, 2008.

Netto, A.P., Andriolo, A., Filho, F.F., Tambascia, M., Gomes, M.B., Melo, M., Sumita, N.M., Lyra, R., Cavalcanti, S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.

Okubo, Y., Nakayama, H., Hasegawa, C., Mitsuda, A., Hatori, T., Tanikawa, K., Shinozaki, M., Shibuya, K. Pathophysiology of invasive fungal infection in diabetic patients. **Nihon Rinsho**, v. 66, n. 12, p. 2327-2333, 2008.

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. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** WHO/NCD/NCS/99.2. Geneva. Ref Type: Report, 1999.

Organização Mundial de Saúde. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em 16 out 2011.

Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M.J., Dodds, A.W., Reid, K.B. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32728-32736, 2004.

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., Zečević, 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.

Porto, J.A. The use of cellophane tape in the diagnosis of Tinea versicolor. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 21, p. 229-231, 1953.

Prompers, L., Huijberts, M., Apelqvist, J., Jude, E., Piaggese, A., Bakker, K., Edmonds, M., Holstein, P., Jirkovska, A., Mauricio, D., Tennvall, G.R., Reike, H., Spraul, M., Uccioli, L., Urbancic, V., Van Acker, K., Van Baal, J., Van Merode, F., Schaper, N. High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. **Diabetologia**, v. 50, n. 1, p. 18-25, 2007.

Rich, P. Onychomycosis and tinea pedis in patients with diabetes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 130-134, 2000.

Roberts, D.T. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: Results of an omnibus survey. **British Journal Dermatology**, v. 126, p. 23-27, 1992.

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.

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.

Rosseew, D. Achllies foot screening project: preliminary results of patients screening by dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology**, v. 12, p. 6-9, 1999.

Roujeau, J.C., Sigurgeirsson, B., Korting, H.C., Kerl, H., Paul, C. Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: A case-control study. **Dermatology**, v. 209, p. 301-307, 2004.

Roy, S., Knox, K., Segal, S., Griffiths, D., Moore, C.E., Welsh, K.I., Smarason, A., Day, N.P., McPheat, W., Crook, D.W., Hill, A.V.S. *MBL* genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. **The Lancet**, v. 359, p. 1569-1573, 2002.

Sales, A.L.C.C., Teixeira, J.M.R., Soares, L.F.M., Damasceno, D.C.F., Almeida, I.P., Nunes, P.H.M., Martins, M.C.C. Dieta enriquecida em fibras e ácidos graxos poli-insaturados: efeitos no controle glicêmico e perfil lipídico de ratos diabéticos. **Ars Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 138-146, 2010.

Sandrin-Garcia, P., Brandão, L.A.C., Coelho, A.V.C., Guimarães, R.L., Pancoto, J.A.T., Segat, L., Donadi, E.A., Lima-Filho, J.L., Crovella, S. Mannose binding lectin gene (*MBL2*) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. **Human Immunology**, v. 72, p. 516-521, 2011.

Santos, I.K.F.M., Costa, C.H.N., Krieger, H., Feitosa, M.F., Zurakowski, D., Fardin, B., Gomes, R.B.B., Weiner, D.L., Harn, D.A., Ezekowitz, A.B., Epstein, J.E. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5212-5215, 2001.

Santos, K.C., Andrioli, J.L. Incidência de fungos em unhas de idosos de um asilo na cidade de Franca-SP. **Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 5, n. 1-6, p. 36-42, 2005.

Santos, M.C.D. **Alterações na qualidade de vida de portadores de Diabetes mellitus tipo I**. 2011. 27f. Monografia (Consórcio Setentrional de educação a Distância) - Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011. Disponível em: <http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/1758/1/2011_MarcosCesarDantasSantos.pdf>. Acesso em 10 dez 2011.

Schlapbach, L.J., Mattmann, M., Thiel, S., Boillat, C., Otth, M., Nelle, M., Wagner, B., Jensenius, J.C., Aebi, C. Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis. **CID**, v. 51, n. 2, p. 153-162, 2010.

Schmiegelow, K., Garred, P., Lausen, B., Andreassen, B., Petersen, B.L., Madsen, H.O. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3757-3760, 2002.

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.

Segat, L., Vasconcelos, L.R.S., Melo, F.M., Silva, B.S., Arraes, L.C., Moura, P., Crovella, S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. **Clinical Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13-17, 2007.

Segat, L., Crovella, S., Comar, M., Milanese, M., Zanotta, N., Fabris, A., Trevisiol, C., Rossi, T., De Seta, F., Campello, C. *MBL2* gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 436-439, 2009.

Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.

Shields, B.M., Hicks, S., Shepherd, M.H., Colclough, K., Hattersley, A.T., Ellard, S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): How many cases are we missing? **Diabetologia**, v. 53, p. 2504-2508, 2010.

Silva, G.K. **O papel dos polimorfismos do gene da proteína de ligação à manose em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26618/000758326.pdf?sequence=1>>. Acesso em 24 nov 2011.

Simões, C., Bandeira, F. Patogênese, Classificação e Diagnóstico do Diabetes mellitus tipo 2. In: Bandeira, F. **Endocrinologia e Diabetes**. 1.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. Cap. 70, p. 807-812.

Stuart, L.M., Takahashi, K., Shi, L., Savill, J., Ezekowitz, R.A.B. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 3220-3226, 2005.

Sumita, N.M., Andriolo, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 3, p. 169-174, 2008.

Szepietowski, J.C., Reich, A., Garlowska, E., Kulig, M., Baran, E. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with Tinea pedis and other dermatomycoses. **Archives of Dermatology**, v. 142, p. 1279-1284, 2006.

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.

Tan, Y., Liu, L., Luo, P., Wang, A., Jia, T., Shen, X., Wang, M., Zhang, S. Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 632-638, 2009.

Tsutsumi, A., Ikegami, H., Takahashi, R., Murata, H., Goto, D., Matsumoto, I., Fujisawa, T., Sumida, T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. **Human Immunology**, v. 64, p. 621-624, 2003.

Tulamo, R., Frösen, J., Junnikkala, S., Paetau, A., Kangasniemi, M., Peláez, J., Hernesniemi, J., Niemelä, M., Meri, S. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. **Laboratory Investigation**, v. 90, p. 168-179, 2010.

Valdimarsson, H. Infusion of plasma-derived mannan-binding lectin (MBL) into MBL-deficient humans. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 768, 2003.

Veer, P., Patwardhan, N.S., Damle, A.S. Study of onychomycosis: Prevailing fungi and pattern of infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 53-56, 2007.

Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Welsh, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 151-159, 2010.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

Worthley, D.L., Bardy, P.G., Mullighan, C.G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. 548-555, 2005.

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.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 278/2010 - CEP/CCS

Recife, 07 de outubro de 2010

Registro do SISNEP FR – 366987

CAAE – 0307.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 307/10

Título: **Susceptibilidade às micoses no Diabetes Mellitus associada ao Polimorfismo do Gene MBL2.**

Pesquisador Responsável: Michele Chianca Macario

Senhor(a) Pesquisador(a):

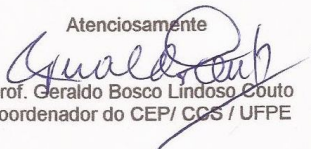
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de outubro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Mestranda Michele Chianca Macario
Programa de Pós- Graduação em Biologia de Fungos- CCB/UFPE

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução 196/06-CNS)

Título da pesquisa: **“Susceptibilidade às micoses no *diabetes mellitus* associada ao polimorfismo do gene *MBL2*”**

Pesquisadora responsável: **Michele Chianca Macario**

Rua Antônio Valdevino da Costa, nº94, aptº201 – Torrões, Recife-PE. Fone: (81) 9790-8511

E-mail: michianca@gmail.com

Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel.: 2126 8588.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa cujo título está acima descrito. Esta propõe o diagnóstico das principais micoses que ocorrem em pacientes portadores de *diabetes mellitus*, relacionando esses dados com a presença de uma mutação em um gene responsável pela imunidade, sendo possível, assim, avaliar o risco dos pacientes em adquirirem essas infecções. As micoses, se não tratadas, podem provocar complicações a sua saúde. No entanto, a avaliação genética ajudará o médico a adotar tratamentos mais eficientes visando o combate a ação dos fungos.

Profissionais capacitados irão realizar as coletas de acordo com o local da micose, de forma correta e segura, utilizando material esterilizado e descartável. Concomitantemente será coletada uma pequena amostra sangüínea (cerca de 4ml) para a análise do gene responsável pela imunidade através de uma simples coleta de sangue com agulhas e seringas esterilizadas, não oferecendo grandes riscos ao paciente. Porém, riscos mínimos como algum tipo de constrangimento e injúria da escarificação podem ocorrer.

Você pode ficar à vontade para não fazer a coleta sem que isso prejudique sua relação com os médicos ou hospital. O material colhido será levado ao Laboratório de Micologia Médica e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco para a realização dos estudos.

Caso você aceite participar deste estudo será beneficiado diretamente com um diagnóstico confiável, podendo iniciar um tratamento de forma mais rápida, ajudando em sua recuperação.

OBS 1: Os dados pessoais dos pacientes serão mantidos em anonimato, sendo garantida a privacidade.

OBS 2: Os pacientes, mesmo após a aprovação do presente termo, poderão retirar-se a qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo para os mesmos.

OBS 3: Uma cópia deste documento será entregue ao paciente voluntário.

Recife, _____ de _____ de _____.

_____ Nome do pesquisador	_____ Assinatura
_____ Nome do paciente	_____ Assinatura
_____ 1ª Testemunha	_____ Assinatura
_____ 2ª Testemunha	_____ Assinatura